

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milka J. Malešević

**Identifikacija i karakterizacija biogenih  
utišivača međućelijske komunikacije vrste  
*Pseudomonas aeruginosa***

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milka J. Malešević

**Identification and characterization of biogenic  
silencers of *Pseudomonas aeruginosa* quorum  
sensing**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

**Mentor:** dr **Branko Jovčić**, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Biološki fakultet, Beograd

**Članovi komisije:** dr **Branko Jovčić**, Redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Biološki fakultet, Beograd

dr **Nemanja Stanisavljević**, Viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

dr **Natalija Polović**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Hemijski fakultet, Beograd

dr **Jelena Lozo**, Vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Biološki fakultet, Beograd

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Jedan deo teze realizovan je na Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Napulj, Italija.*

*Ovom prilikom želim da se zahvalim:*

*Mentoru prof. dr Branku Jovčiću na neiscrpnim idejama, preduzumljivosti, kao i na svesrdnoj pomoći tokom izrade i pisanja ove teze. Hvala na pruženoj slobodi, ukazanom poverenju u mene lično i ishod ovog rada, strpljenju i beskrajnom optimizmu. Iznad svega, hvala na važnim profesionalnim i životnim lekcijama.*

*Dr Nemanji Stanisavljeviću za dragocene savete i nesebičnu pomoć iz sveta biohemije, na uloženom vremenu i trudu prilikom izrade eksperimenata i tumačenja dobijenih rezultata, kao i za kritičku ocenu teze. Nemanji posebno hvala na vedrom duhu, prijateljskoj saradnji i iskrenoj podršci.*

*Prof. dr Nataliji Polović na odličnoj saradnji, ogromnoj pomoći i sugestijama koje su bile od neprocenjivog značaja prilikom izrade ove teze, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Prof. dr Jeleni Lozo na savetima, korisnim sugestijama koje su unapredile ovu tezu, kao i na kritičkoj oceni teze.*

*Zahvalnost dugujem dr Milanu Kojiću na pruženoj prilici da svoje prve istraživačke korake načinim na polju molekularne mikrobiologije, a potom da tim putem nastavim do konačne realizacije ove teze. Hvala što je svojim znanjem i iskustvom dao značajan doprinos u rešavanju problema nastalih tokom eksperimentalnog rada, na brojnim savetima i dostupnosti u svakom trenutku.*

*Koristim priliku da se zahvalim prof. dr Antonio Molinaro i dr Flaviana Di Lorenzo, sa Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Napulj, Italija na stručnoj pomoći prilikom savladavanja metoda koje su omogućile dobijanje dela rezultata predstavljenih u ovoj tezi. Hvala 'Satellites' posadi što su me toplo prihvatili u svoj krug i pomogli da upoznam duh Napulja i Napolitanaca. Grazie mille!*

*Najiskrenije hvala Lab 06 družini - Amareli, Đorđu, Jeleni, Ivani, Nataši, Mici, Maji, Kaći, Jecku, Goksiju, Mirkoviću, Brankici, Dušanki, Jovanki, Danki, Goci, Mariji, Popoviću, Kaći, Mikiju, Cecili, Dušku, Emi, Mini, Lazaru, Nidži, na prijatnoj radnoj, ali i drugarskoj atmosferi, kao i na svim lepim trenucima. Mini i Abrovima, mojim sapatnicima, za kovanje planova, beskonačna ćućorenja, smeh i nezaboravne momente kako u labu, tako i drugde.*

*Koprivo, Stefane, Dobri Ljudu, Cjeco, Spaso, Igore, Laki, što ste uvek tu i što shvatate moje bosanske "sve mi je jasno i ništa ne kontam" momente. Hvala vam na svim toplim zagrljajima, najiskrenijem prijateljstvu i zdravorazumskom poimanju sveta.*

*Hvala mojim dragim Maleševićima i Golićima, što pomno prate svaki moj korak i što mi vazda pružaju neizmernu ljubav i beskrajnu podršku.*

*A najviše hvala mami, tati, Neci, Žari i Neđi. Najdraža moja bića, vama dugujem sve!*



*familiji mojoj*

# Identifikacija i karakterizacija biogenih utišivača međucelijske komunikacije vrste *Pseudomonas aeruginosa*

## REZIME

Nemogućnost kontrole pojave i širenja rezistencije na antibiotike usmerila je istraživanja u poslednje dve dekade ka iznalaženju novih terapijskih opcija, sa ciljem tretmana infekcija izazvanih patogenim bakterijama rezistentnim na veći broj klinički značajnih antibiotika. Uzevši u obzir činjenicu da je antibiotska rezistencija kompleksan, multifaktorijski fenomen, rešenje ovog problema uključuje niz pristupa usmerenih na kontrolu faktora koji olakšavaju nastanak i širenje rezistencije. Jedan od tih pristupa sastoji se u razvoju novih terapeutika koji bi delovali mehanizmima različitim od trenutno dostupnih antibiotika. U tom pogledu, antivirulentna terapija zamišljena je kao obećavajuća alternativa sa ciljem kontrole virulencije specifične za određene patogene, bez vršenja snažnog selektivnog pritiska na bakterijske ćelije. Imajući u vidu da je *Pseudomonas aeruginosa* jedan od vodećih uzročnika unutarbolničkih infekcija širom sveta, lečenje infekcija izazvanih ovim patogenom predstavlja veliki terapijski izazov. *P. aeruginosa* svoj patogeni potencijal ostvaruje zahvaljujući mnogobrojnim urođenim, stečenim i adaptivnim mehanizmima rezistencije. Pored toga, posedovanje sistema međucelijske komunikacije (eng. *quorum sensing*, QS) ovom patogenu omogućava fleksibilnost u regulaciji ekspresije gena uključenih u virulenciju, formiranje biofilma, produkciju sekundarnih metabolita i faktora koji imaju ulogu u zaštiti od imunskog sistema domaćina. Stoga bi primena antivirulentne terapije zasnovane na utišavanju međucelijske komunikacije bakterija mogla poslužiti kao obećavajuće oruđe u kontroli infekcija izazvanih predstavnicima *P. aeruginosa* za koje ne postoji adekvatna terapija trenutno dostupnim antibioticima.

U skladu sa time, predmet proučavanja ove teze bila je potraga za novim utišivačima međucelijske komunikacije bakterija (eng. *quorum quenching*, QQ) produkovanih od strane kliničkih izolata koji tokom infekcija dele istu ekološku nišu sa *P. aeruginosa*. Analizirana je kolekcija Gram-negativnih kliničkih izolata Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu sa ciljem pronalaženja sojeva koji proizvode QQ molekule. Nakon odabira sojeva nosioca QQ fenotipa, usledila je njihova identifikacija kao i funkcionalna karakterizacija na model sistemu kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83. Upotrebom *Chromobacterium violaceum* CV026 biosenzora, selektovano je 19 sojeva (od ukupno 633 analiziranih izolata) koji su ispoljavali QQ fenotip, od kojih su dva izolata *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135, na osnovu najznačajnije QQ aktivnosti izdvojena za detaljniju karakterizaciju. Utvrđeno je da *Delftia* sp. 11304 soj pripada *Delftia tsuruhatensis* vrsti, dok *Burkholderia* sp. BCC4135 pripada *Burkholderia cepacia* vrsti sa novim sekvencnim tipom ST1485. *In silico* analizom genomskih sekvenci ustanovljeno je da oba odabrana soja poseduju izuzetan potencijal virulencije i rezistencije na antimikrobna jedinjenja. Priroda QQ molekula koje proizvode ovi sojevi bila je različita; konstatovano je da soj 11304 proizvodi male molekule neproteinske prirode (QS inhibitore, QSI), dok BCC4135 proizvodi QQ enzime. Pored toga, kod BCC4135 izolata utvrđeno je prisustvo i QS fenomena.

Ukupni etil-acetatni ekstrakt supernatanta soja *D. tsuruhatensis* 11304 (QSI ekstrakt) ostvario je značajan antivirulentni potencijal na model sistemu kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83. Fluorescentnom mikroskopijom ustanovljeno je da QSI ekstrakt sprečava formiranje biofilma, ali ne i

dekompoziciju formiranog biofilma, što je najverovatnije posledica nepropustljivosti matriksa biofilma za aktivne komponente QSI ekstrakta. Takođe, uočeno je da je osetljivost višestruko rezistentnog kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 na meropenem i gentamicin povećana kroz sinergističko delovanje QSI ekstrakta sa primenjenim antibioticima, a ustanovljen je i njegov dozno-zavisani efekat na produkciju ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, piocijanina i ramnolipida. Anti-QS potencijal QSI ekstrakta soja 11304 potvrđen je i na transkripcionom nivou, pri čemu je zabeležen njegov uticaj na smanjenje ekspresije gena koji čine deo *las*, *rhl* i *pqs* QS mreže vrste *P. aeruginosa*. Na osnovu kompozicione analize QSI ekstrakta primenom instrumentalne metode matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (MALDI) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom, ustanovljeno je da sastav ekstrakta čine N-acil-homoserin laktoni (AHL) dugog bočnog acilnog lanca od C12 do C18 atoma. Najdominantnije prisutan bio je N-oktadekanoil homoserin lakton (C18-HSL), a po prvi put je detektovano prisustvo dihidroksi-N-oktadekanoil homoserin laktone (dihidroksi-C18-HSL) u uzorku biološkog porekla. Tretman *P. aeruginosa* MMA83 komercijalnim C18-HSL rezultirao je smanjenjem produkcije piocijanina i ekspresije *lasI* (QS) gena. Budući da je efekat komercijalnog C18-HSL znatno manji u odnosu na antivirulentnu aktivnost ukupnog QSI ekstrakta, pretpostavlja se da je anti-QS delovanje posledica združene aktivnosti većeg broja komponenata poreklom iz 11304 QSI ekstrakta.

Drugi deo ove teze odnosi se na identifikaciju utišivača međućelijske komunikacije bakterija poreklom iz kliničkog izolata *B. cepacia* BCC4135 kao i ispitivanje njihovog antivirulentnog potencijala. Analizom genomske sekvence soja BCC4135 otkriveno je da poseduje gene za dve QQ laktonaze YtnP i Y2-*aiiA*. Oba enzima pripadaju superfamiliji metalo- $\beta$ -laktamaza i dele oko 40% identičnosti aminokiselinske sekvence sa filogenetski najrodnijim do sada opisanim AHL laktonazama, dok međusobno dele identičnost od 37%. Predikcionom analizom ustanovljeno je da Y2-*aiiA* laktonaza poseduje signalnu sekvencu za eksport na N-terminusu, te je stoga pretpostavljeno da je u pitanju ekstracelularni enzim. Takođe, iako u javno dostupnim bazama podataka postoje deponovane sekvence pretpostavljenih QQ laktonaza poreklom iz *Burkholderia* vrsta, u okviru ove studije po prvi put je izvršeno njihovo kloniranje, ekspresija i funkcionalna karakterizacija. Ustanovljeno je da optimalna temperatura enzimske aktivnosti YtnP i Y2-*aiiA* iznosi 40°C, dok su obe rekombinantne laktonaze pokazale umerenu termostabilnost. U pogledu dužine bočnih acilnih lanaca AHL oba enzima ispoljila su široku supstratnu specifičnost. YtnP enzim pokazao je veći afinitet za AHL kratkih i srednje dugih acilnih lanaca, dok je Y2-*aiiA* ostvario značajnu efikasnost u degradaciji AHL kako kratkih tako i dugih acilnih lanaca, ispoljivši veću specifičnost za AHL dugog lanca. Dobijeni rezultati ukazuju da jedino Y2-*aiiA* poseduje sposobnost degradacije N-tetradekanoil homoserin laktone (C14-HSL), nagoveštavajući postojanje razlike u biološkoj ulozi ovih enzima sa stanovišta autoregulacije QS sistema soja BCC4135 i interferencije sa QS sistemima bakterija sa kojima dele istu ekološku nišu. Analizom aktivnosti promotora *ytnP* i *y2-aiiA* gena koji kodiraju BCC4135 laktonaze, konstatovana je zavisnost aktivnosti promotorskih fuzija od faze rasta bakterijske kulture, pri čemu je u različitim fazama zabeležena maksimalna aktivnost promotora (*ytnP* promotorska fuzija u ranoj stacionarnoj fazi rasta a *y2-aiiA* promotorska fuzija u kasnoj stacionarnoj fazi rasta). RT-qPCR analizom potvrđeno je da je ekspresija gena koji kodiraju *B. cepacia* BCC4135 QQ laktonaze regulisana na isti način kao i aktivnost njihovih promotora - zavisno od faze rasta bakterijske kulture. Antivirulentni potencijal BCC4135 rekombinantnih laktonaza utvrđen je na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83, pri čemu su oba enzima pokazala inhibitorno dejstvo na proces formiranja biofilma kao i na produkciju ekstracelularnih faktora virulencije (elastaza, piocijanina i ramnolipida). Njihov anti-QS efekat potkrepljen je i na transkripcionom nivou. Osim uticaja na *las* i *rhl* puteve, YtnP i Y2-*aiiA* utišavaju i *pqs* QS mrežu bakterije *P. aeruginosa*, što je po prvi put otkriveno među QQ laktonazama. Zatim,

primena BCC4135 rekombinantnih laktonaza zajedno iskazuje značajniji efekat na utišavanje QS sistema u odnosu na primenu svakog od enzima pojedinačno. Takođe, Y2-aiiA laktonaza pokazala je veću efikasnost u smanjenju ekspresije svih analiziranih gena uključenih u QS sistem *P. aeruginosa* MMA83 kliničkog izolata. Nijedna od rekombinantnih laktonaza soja BCC4135 nije ostvarila citotoksičan efekat na ćelijsku liniju HaCaT humanih keratinocita. Najzad, u okviru ovog istraživanja utvrđeno je da *B. cepacia* BCC4135 koristi globalnu regulatornu QS mrežu CepI/R (AnoI/R) visoko konzervisanu među vrstama pripadnicima *Burkholderia cepacia* kompleksa i na taj način reguliše sopstveni virulentni potencijal i verovatno vrši autoregulaciju QQ/QS mreže kroz različitu ekspresiju i aktivnost YtnP i/ili Y2-aiiA laktonaza.

**Ključne reči:** međućelijska komunikacija bakterija, virulencija, biofilm, utišavanje međućelijske komunikacije bakterija, antivirulentni agensi, inhibitori međućelijske komunikacije, laktonaze, *Pseudomonas aeruginosa*, *Delftia tsuruhatensis*, *Burkholderia cepacia*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija prokariota

**UDK broj:**

# Identification and characterization of biogenic silencers of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing

## ABSTRACT

The inability to control the emergence and spread of antibiotic resistance has driven research towards finding novel therapeutic options to combat multidrug-resistant pathogenic bacteria during the last two decades. Given the fact that antimicrobial resistance is a complex, multifactorial phenomenon, the solution to this problem comprises a range of approaches focused on monitoring the factors that facilitate the emergence and spread of resistance. One of proposed strategies consists of developing novel therapeutics that operate under different principles to the currently available antibiotics. In this respect, antivirulence therapy has been conceived as a promising alternative to control virulence in a pathogen-specific manner, without exerting strong selective pressure on the bacterial cells. Having in mind that *Pseudomonas aeruginosa* has been considered as a leading cause of nosocomial infections worldwide, the treatment of infections caused by this pathogen represents a major therapeutic challenge. The pathogenic potential of *P. aeruginosa* has been accomplished due to a numerous innate, acquired, and adaptive resistance mechanisms. In addition, the presence of cell-to-cell communication system (quorum sensing, QS) allows this pathogen the flexibility in the regulation of virulence gene expression responsible for biofilm development, production of secondary metabolites, and immune-evasive factors. Therefore, the use of antivirulence therapy based on the silencing of bacterial communication could serve as a promising tool in the control of infections caused by *P. aeruginosa* for which there is no adequate therapy with currently available antibiotics.

Accordingly, the subject of this thesis was discovery and characterization of novel quenchers of bacterial cell-to-cell communication produced by clinical isolates that share the same ecological niche with *P. aeruginosa* during infections. A collection of Gram-negative clinical isolates from the Laboratory for Molecular Microbiology Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering University of Belgrade was analyzed in order to select the strains that produce quorum quenching (QQ) molecules. After the selection of strains carrying QQ phenotype, the identification of QQ molecules as well as their functional characterization on the model system of *P. aeruginosa* MMA83 clinical isolate was performed. Using *Chromobacterium violaceum* CV026 biosensor, 19 strains (out of a total of 633 analyzed isolates) with QQ phenotype were discovered, among which two clinical isolates *Delftia* sp. 11304 and *Burkholderia* sp. BCC4135 have been selected as strongest producers of QQ molecules for detailed characterization. According to the genomic sequence analysis, *Delftia* sp. 11304 was identified as a *Delftia tsuruhatensis* species while *Burkholderia* sp. BCC4135 was unveiled as *Burkholderia cepacia* with novel sequence type ST1485. *In silico* analysis of genomic sequences indicated that both selected strains possess significant antimicrobial resistance and virulence potential. The nature of the QQ molecules produced by these strains was determined as different; strain 11304 was found to produce small molecules of non-proteinaceous nature (QS inhibitors, QSI), while BCC4135 produced QQ enzymes. Besides, the presence of the QS phenomenon was determined in BCC4135 isolate.

The total ethyl acetate extract of the *D. tsuruhatensis* 11304 culture supernatant (QSI extract) showed significant antivirulence potential on the model system of clinical isolate *P. aeruginosa*

MMA83. Fluorescence microscopy revealed that QSI extract prevented biofilm formation, but was unable to cause biofilm decomposition, which is most likely a consequence of the biofilm matrix impermeability for active molecules present in QSI extract or possibility that it acts through QS inhibition. In addition, it was found that the sensitivity of the multidrug-resistant clinical isolate *P. aeruginosa* MMA83 to meropenem and gentamicin was enhanced by the synergistic interaction of the QSI extract with antibiotics. A dose-dependent reduction of extracellular virulence factors elastase, pyocyanin, and rhamnolipid production of MMA83 was observed. The anti-QS potential of QSI extract was confirmed at the transcriptional level, with its effect on reduction of the expression of genes belonging to three *P. aeruginosa* QS networks *las*, *rhl*, and *pqs*. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry compositional analysis of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract revealed the presence of N-acyl homoserine lactones (AHLs) with acyl side chain lengths of C12 to C18. The main ion peak was identified as N-octadecanoylhomoserine lactone (C18-HSL) and for the first time, a naturally occurring dihydroxy-N-octadecanoylhomoserine lactone (dihydroxy-C18-HSL) was detected. Commercial C18-HSL reduced pyocyanin production as well as mRNA level of the *P. aeruginosa lasI* gene. Since the limited effect of commercial C18-HSL comparing to the antivirulence effect of the entire 11304 QSI extract was found, it is assumed that the anti-QS activity could not be attributed solely to C18-HSL but to a synchronized activity of several molecules produced by the *D. tsuruhatensis* 11304 present in QSI extract.

The second part of this thesis refers to the identification of molecules that interfere with the QS system originating from *B. cepacia* BCC4135 clinical isolate as well as the examination of their antivirulence potential. The expression of the QQ phenotype in BCC4135 isolate was attributed to the proteinaceous molecules, QQ lactonases YtnP and Y2-aiiA. Both enzymes belong to the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily of proteins and share around 40% of the amino acid sequence identity with their phylogenetically closest AHL lactonases, while shared 37% identity to each other. The prediction analysis revealed that Y2-aiiA lactonase possesses a signal peptide sequence at the N-terminus, and is therefore presumed to be an extracellular enzyme. Additionally, although there are deposited sequences of putative QQ lactonases derived from *Burkholderia* species in the publicly available databases, their cloning, expression, and functional validation were performed for the first time in this study. The temperature optimum of the enzyme activity of YtnP and Y2-aiiA was 40°C, while both recombinant lactonases displayed moderate thermostability. Analysis of the enzymatic potential of YtnP and Y2-aiiA revealed that, with regard to the acyl chain length of AHLs, both lactonases exhibited a broad substrate specificity and efficient degradation of the AHL molecules. YtnP showed a higher preference for short and middle-long chain AHLs, while Y2-aiiA was efficient against both short- and long-chain AHLs, even with greater specificity towards long chain AHLs. The obtained results indicate that only Y2-aiiA exhibited the ability to degrade N-tetradecanoylhomoserine lactone (C14-HSL), suggesting a difference in the biological role of these enzymes from the aspect of QS system autoregulation in BCC4135 and interference with QS systems of bacteria within the same ecological niche. The growth-phase dependence of the *ytnP* and *y2-aiiA* gene promoter activity was found, with maximum activity observed within different growth phases (*ytnP* promoter in a stationary growth phase and *y2-aiiA* promoter fusion in the late stationary growth phase). The transcription analysis confirmed that the expression level of *B. cepacia* BCC4135 lactonases QQ genes is regulated in the same manner as the activity of their promoters - depending on the growth phase of the bacterial culture. The antivirulence potential of BCC4135 recombinant lactonases was established on the *P. aeruginosa* MMA83 model system; both enzymes showed an inhibitory effect on the biofilm-forming ability as well as on the virulence factors production (elastase, pyocyanin, and rhamnolipid). Their anti-QS effect was also confirmed at the transcriptional level. In addition to quenching the *las*

and *rhl* pathways, YtnP and Y2-aiiA were shown to be able to reduce the *pqs* QS network of *P. aeruginosa*, which is a feature revealed for the first time among QQ lactonases. Furthermore, the mix of the enzymes was superior to a single enzyme application interfering with the QS circuit. Additionally, Y2-aiiA lactonase shown to be more effective in lowering the expression of all genes involved in QS network of *P. aeruginosa* MMA83 clinical isolate. Neither of *B. cepacia* BCC4135 recombinant lactonases were found to have a cytotoxic effect on the human keratinocyte HaCaT cell line. Finally, the results obtained in our study have shown that *B. cepacia* BCC4135 uses CepI/R (AnoI/R) global regulatory QS system for governing its own virulence traits and possibly self-regulates the QQ/QS network through the different expression and activity of YtnP and/or Y2-aiiA lactonases.

**Keywords:** quorum sensing, virulence, biofilm, quorum quenching, antivirulence agents, quorum sensing inhibitors, lactonase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Delftia tsuruhatensis*, *Burkholderia cepacia*

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular biology of prokaryotes

**UDC number:**

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	2
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - identifikacija i etimologija.....	2
1.2. Opšta svojstva <i>P. aeruginosa</i> .....	2
1.3. <i>P. aeruginosa</i> kao uzročnik infekcija .....	3
1.4. Mehanizmi rezistencije na antibiotike vrste <i>P. aeruginosa</i> .....	4
1.5. Faktori virulencije vrste <i>P. aeruginosa</i> .....	5
1.5.1. Međucelijska komunikacija bakterija .....	5
1.5.2. Međucelijska komunikacija vrste <i>P. aeruginosa</i> .....	8
1.5.3. Ekstracelularni faktori virulencije.....	10
1.5.3.1. Elastaze .....	10
1.5.3.2. Piocijanin .....	11
1.5.3.3. Ramnolipidi.....	11
1.5.4. Biofilm .....	11
1.6. Terapija zasnovana na inhibiciji patogenosti bakterija - antivirulentna terapija .....	14
1.6.1. Mali molekuli utišivači međucelijske komunikacije bakterija (QSI) .....	15
1.6.2. <i>Quorum quenching</i> enzimi (QQE).....	16
1.6.3. Primena QQ molekula u medicini i biotehnologiji .....	18
1.7. <i>Delftia tsuruhatensis</i> .....	19
1.8. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	20
<b>2. Ciljevi istraživanja</b> .....	22
<b>3. Materijal i metode</b> .....	24
3.1. Bakterijski sojevi i derivati .....	24
3.2. Korišćeni i konstruisani plazmidi .....	25
3.3. Medijumi za kultivaciju bakterija .....	26
3.4.1. Selekcija izolata sa <i>quorum quenching</i> (QQ) aktivnošću .....	26
3.4.2. Selekcija izolata sa <i>quorum sensing</i> (QS) fenotipom .....	27
3.5. Ispitivanje prirode QQ molekula.....	27
3.6. Priprema neprečišćenog ekstrakta QQ molekula .....	28
3.7. Metode rada sa DNK molekulima bakterija .....	28
3.7.1. Izolacija ukupne DNK iz bakterija.....	28
3.7.2. Izolacija plazmidne DNK iz <i>E. coli</i> .....	28



3.7.3. Izolacija plazmidne DNK iz <i>E. coli</i> za potrebe sekvenciranja i kloniranja .....	29
3.7.4. Sečenje DNK restrikcijom enzimima .....	29
3.7.5. Ligacija DNK fragmenata .....	29
3.7.6. Umnožavanje DNK fragmenata .....	29
3.7.7. Sekvenciranje DNK fragmenata .....	30
3.7.8. Sekvenciranje celokupnog genoma .....	31
3.7.9. Horizontalna gel elektroforeza DNK .....	31
3.8. Genetičke manipulacije .....	31
3.8.1. Kloniranje gena koji kodiraju QQ enzime .....	31
3.8.2. Konstrukcija promotorskih fuzija .....	31
3.9. Transformacija <i>E. coli</i> ćelija .....	32
3.9.1. Priprema <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija .....	32
3.9.2. Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> ćelija toplotnim šokom .....	32
3.10. Triparentalna konjugacija .....	32
3.11. $\beta$ -galaktozidazni esej .....	33
3.12. Metode rada sa proteinima .....	33
3.12.1. Prečišćavanje rekombinantnih proteina YtnP i Y2-aiiA u denaturišućim uslovima .....	33
3.12.2. Merenje koncentracije proteina .....	34
3.12.3. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza .....	34
3.13. Metode rada sa RNK molekulima bakterija .....	35
3.13.1. Kultivacija bakterija za potrebe izolacije RNK .....	35
3.13.2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija .....	35
3.13.3. Prečišćavanje bakterijske RNK od DNK molekula .....	36
3.13.4. Reverzna transkripcija RNK .....	36
3.13.5. Kvantitativni PCR u realnom vremenu - RT-qPCR .....	37
3.14. Funkcionalna karakterizacija <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakta i <i>B. cepacia</i> BCC4135 QQ enzima na model sistemu <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	39
3.14.1. Uticaj bioaktivnih molekula na formiranje biofilma <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	39
3.14.1.1. Kristal violet bojenje .....	39
3.14.1.2. Fluorescentna mikroskopija .....	39
3.14.2. Efekat kombinacije <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakta i antibiotika na rast <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	40
3.14.3. Uticaj biogenih molekula na produkciju elastaze .....	41
3.14.4. Uticaj biogenih molekula na produkciju piocijanina .....	41
3.14.5. Uticaj biogenih molekula na produkciju ramnolipida .....	42

3.15. Esej bioluminiscencije .....	42
3.16. Termostabilnost bioaktivnih molekula.....	42
3.17. Biohemijske metode.....	43
3.17.1. Tankoslojna hromatografija (TLC).....	43
3.17.2. Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (MALDI) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom .....	43
3.17.3. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) .....	44
3.18. Ispitivanje citotoksičnog efekta <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaza na ćelijskoj liniji humanih keratinocita .....	44
3.18.1. Tretman humanih HaCaT keratinocita sa <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonazama .....	44
3.18.2. Test citotoksičnosti <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaza .....	45
3.19. Bioinformatičke analize .....	45
3.19.1. Analiza nukleotidnih sekvenci .....	45
3.19.2. Analiza celokupnog genoma.....	45
3.19.3. Filogenetska analiza QQ enzima.....	46
3.19.4. Analiza prisustva signalne sekvence peptida .....	46
3.20. Statistička obrada podataka.....	47
<b>4. Rezultati</b> .....	49
4.1. Selekcija kliničkih izolata sa <i>quorum quenching</i> (QQ) fenotipom.....	49
4.2. Zavisnost produkcije QQ molekula od faze rasta sojeva <i>Delftia</i> sp. 11304 i <i>Burkholderia</i> sp. BCC4135.....	50
4.3. Vremenska zavisnost ispoljavanja QS fenotipa soja <i>Burkholderia</i> sp. BCC4135.....	52
4.4. Genomska analiza sojeva <i>Delftia</i> sp. 11304 i <i>Burkholderia</i> sp. BCC4135 .....	52
4.5. <i>B. cepacia</i> BCC4135 kodira dve N-acil-homoserin (AHL) laktonaze i QS sistem .....	54
4.6. Kloniranje, ekspresija i prečišćavanje <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaza .....	57
4.7. Svojstva bioaktivnih molekula.....	59
4.7.1. Stabilnost <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 molekula inhibitora <i>quorum sensing</i> sistema (QSI) i priprema QSI ekstrakta .....	59
4.7.2. Termostabilnost <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaza .....	60
4.8. Esej bioluminiscencije .....	61
4.9. Laktonaze soja <i>B. cepacia</i> BCC4135 poseduju široku supstratnu specifičnost.....	62
4.10. Funkcionalna karakterizacija bioaktivnih molekula na model sistemu <i>P. aeruginosa</i> MMA83... 64	
4.10.1. <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakt ostvaruje anti-biofilm efekat - kristal violet bojenje.....	64
4.10.2. Fluorescentna mikroskopija .....	65
4.10.2.1. <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakt sprečava formiranje, ali ne i dekompoziciju formiranog biofilma .....	65

4.10.2.2. <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaze inhibiraju formiranje biofilma <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	66
4.10.3. Uticaj bioaktivnih molekula na produkciju ekstracelularnih faktora virulencije.....	67
4.10.3.1. <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakt inhibira produkciju faktora virulencije <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	67
4.10.3.2. <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaze inhibiraju produkciju faktora virulencije <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	68
4.10.4. <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakt ostvaruje sinergistički efekat sa antibioticima .....	69
4.11. Zavisnost promotorske aktivnosti gena koji kodiraju <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaze od faze rasta bakterijske kulture .....	70
4.12. Transkripciona analiza .....	71
4.12.1. <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakt inhibira ekspresiju gena uključenih u <i>P. aeruginosa</i> MMA83 QS sistem .....	71
4.12.2. <i>B. cepacia</i> BCC4135 laktonaze smanjuju nivo ekspresije gena uključenih u <i>P. aeruginosa</i> MMA83 QS sistem .....	72
4.12.3. Vremenska zavisnost ekspresije gena uključenih u QS i QQ mrežu soja <i>B. cepacia</i> BCC4135 .....	73
4.13. Utvrđivanje sastava <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 QSI ekstrakta primenom MALDI u kombinaciji sa masenom spektrometrijom .....	74
4.14. Komercijalni C18-HSL redukuje produkciju piocijanina i ekspresiju <i>lasI</i> gena <i>P. aeruginosa</i> MMA83 .....	76
4.15. Laktonaze soja <i>B. cepacia</i> BCC4135 ne ostvaruju citotoksičan efekat na HaCaT keratinocite....	77
<b>5. Diskusija</b> .....	79
5.1. <i>Delftia tsuruhatensis</i> 11304 je izvor QSI molekula.....	80
5.2. <i>Burkholderia cepacia</i> BCC4135 ostvaruje antivirulentni potencijal posredstvom QQ laktonaza ..	84
5.3. Biološka uloga i terapijski potencijal bioaktivnih QSI i QQ molekula poreklom iz <i>D. tsuruhatensis</i> 11304 i <i>B. cepacia</i> BCC4135 .....	89
<b>6. Zaključci</b> .....	91
<b>7. Literatura</b> .....	95
<b>8. Prilozi</b> .....	125
8.1. Prilog 1.....	125
8.2. Prilog 2.....	125
8.3. Prilog 3.....	127
8.4. Prilog 4.....	128
8.5. Prilog 5.....	131
8.6. Prilog 6.....	134
8.7. Prilog 7.....	134

## SPISAK SKRAĆENICA

ACN	acetonitril
ACP	eng. <i>acyl carrier protein</i>
AHL	N-acil-homoserin lakton
AI	autoinducer
ATCC	eng. <i>American type culture collection</i>
bp	bazni par
Bck	<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks
BLAST	eng. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	eng. <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CARD	eng. <i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
c-di-GMP	ciklični di-guanozin monofosfat
cDNK	komplementarna DNK
CFU	eng. <i>colony-forming units</i>
CHCA	eng. <i><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
C4-HSL	N-butiril homoserin lakton
C6-HSL	N-heksanoil homoserin lakton
C8-HSL	N-oktanoil homoserin lakton
C10-HSL	N-dekanoil homoserin lakton
C14-HSL	N-tetradekanoil homoserin lakton
C16-HSL	N-heksadekanoil homoserin lakton
C18-HSL	N-oktadekanoil homoserin lakton
dihidroksi-C18-HSL	dihidroksi-N-oktadekanoil homoserin lakton
DMEM	eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetil-sulfoksid
ECDC	eng. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
eDNK	ekstracelularna DNK
EPS	egzopolisaharid
FIK	frakciona inhibitorna koncentracija
HPLC	eng. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSL	homoserin lakton
IMGGI	Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
Iqs	eng. <i>integrated quorum sensing</i>
iRNK	informaciona RNK
LA	Luria-Bertani agar
LB	Luria-Bertani bujon
LCPS	eng. <i>light counts per second</i>

LDH	eng. <i>Lactate Dehydrogenase</i>
LMM	Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju
MALDI	eng. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MDR	eng. <i>multi-drug resistant</i>
MFS	eng. <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MH	eng. <i>Mueller-Hinton</i>
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MLST	eng. <i>MultiLocus Sequence Typing</i>
MS	eng. <i>Mass Spectrometry</i>
MU	eng. <i>Miller unit</i>
OD	eng. <i>optical density</i>
ONPG	eng. <i>ortho-nitrophenyl-<math>\beta</math>-galactoside</i>
NCBI	eng. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM-1	Nju Delhi metalo- $\beta$ -laktamaza 1
NJ	eng. <i>Neighbor-Joining</i>
PBS	eng. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	eng. <i>Propidium Iodide</i>
PQS	eng. <i>Pseudomonas aeruginosa quinolone signal</i>
QS	eng. <i>quorum sensing</i>
QSI	eng. <i>quorum sensing inhibitor</i>
QQ	eng. <i>quorum quenching</i>
QQE	eng. <i>quorum quenching enzyme</i>
R	receptor
RAST	eng. <i>Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
RND	eng. <i>Resistance-Nodulation-Division</i>
RT-qPCR	eng. <i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SAM	S-adenozil metionin
SDS	eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	eng. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ST	eng. <i>sequence type</i>
TFA	eng. <i>trifluoroacetic acid</i>
TLC	eng. <i>Thin-layer chromatography</i>
VFDB	eng. <i>Virulence factor database</i>
XDR	eng. <i>extensively drug-resistant</i>
3-okso-C12-HSL	N-3-okso-dodekanoil homoserin lakton
3-okso-C18-HSL	N-3-okso-oktadekanoil homoserin lakton

# **Uvod**

## 1. UVOD

### 1.1. *Pseudomonas aeruginosa* - identifikacija i etimologija

Prvi podaci o bakterijskoj vrsti *Pseudomonas aeruginosa* datiraju iz druge polovine XIX veka, kada je francuski vojni lekar Šarl Sedio (Charles Sédillot) uočio pojavu plavo-zelenkaste boje prilikom previjanja rana kod povređenih vojnika. Nešto kasnije ustanovljeno je da ta boja potiče od pigmenta piocijanina (Lister et al., 2009). Prvo uspešno izolovanje ovog mikroorganizma obavio je Karl Gesard (Carle Gessard) 1882. godine i nazvao ga *Bacillus pyocyaneus* (Al-Wrafiy et al., 2017). Tokom vremena naziv i klasifikacija ove vrste menjali su se više puta. Naziv *Pseudomonas* prvi put je upotrebljen 1900. godine (lat. *pseudo* - lažno; *monas* - jedinica) pri čemu je vrsta tada nazvana *Pseudomonas pyocyanea*. Epitet *aeruginosa* (lat. *aeruginosus* - pun bakarne rđe, zelen), upotrebljen je nešto kasnije, a potom je preovladao te se i danas koristi (Palleroni, 2010).

### 1.2. Opšta svojstva *P. aeruginosa*

Vrsta *P. aeruginosa* je Gram-negativna, štapićasta bakterija (bacil), dimenzija 1,5-3,0 μm sa 0,5-0,8 μm. Pripadnici ove vrste kreću se, uglavnom, pomoću jedne polarne flagele, dok neki sojevi mogu imati dve ili tri flagele (Novik et al., 2015). Klinički izolati poseduju pile, koje ih štite od fagocitoze i imaju ulogu u uspostavljanju kontakta bakterija sa podlogom prilikom formiranja biofilma, pospešujući kolonizaciju. *P. aeruginosa* je nefermentativni, nesporulišući aerob, koji koristi energiju iz procesa oksidacije. Ustanovljeno je da kao izvor energije može koristiti više od 70 različitih organskih jedinjenja. Iako je aerobni organizam, može rasti i u anaerobnim uslovima pri čemu koristi nitrate i arginin kao akceptore elektrona (Filiatrault et al., 2006). Nutritivna raznolikost ovom mikroorganizmu omogućava kolonizaciju veoma različitih niša i široku rasprostranjenost u okruženju (Silby et al., 2011). Širokoj rasprostranjenosti doprinosi i njegova otpornost na visoke koncentracije soli, antiseptike, boje i brojne klinički relevantne antibiotike. Optimalna temperatura za njegov rast je 37°C, mada uspešno preživljava u temperaturnom opsegu od 4 do 42°C (LaBauve & Wargo, 2012). Sposobnost da raste na 42°C izdvaja *P. aeruginosa* od drugih vrsta pripadnika roda *Pseudomonas*.

Genom *P. aeruginosa* čini jedan cirkularni hromozom i varijabilan broj plazmida. Pripadnici ove vrste imaju velike genome (~5-7 Mb), GC sastava 65-67%, što im omogućava izuzetan genetički diverzitet i metabolički kapacitet (Moradali et al., 2017). Značajan procenat genomske sekvence je visoko konzervisan, dok se plastičnost genoma ogleda u prisustvu aksesornih DNK elemenata i genomskih ostrva (Klockgether et al., 2011).

Premda se ova bakterijska vrsta prevashodno smatra kosmopolitskim mikroorganizmom, najnoviji podaci dobijeni meta-analizom ukazuju da je prisustvo *P. aeruginosa* u okruženju najučestalije na staništima usko povezanim sa ljudskom aktivnošću (Crone et al., 2019).

Biotehnološki značaj *P. aeruginosa* ogleda se kroz njegovu primenu u bioremedijaciji i biokontroli (Silby et al., 2011; Chatterjee et al., 2016), njegovi sekundarni metaboliti imaju svojstva

insekticida (Pinjari et al., 2013), ostvaruju antifungalnu (Kumar et al., 2005; Morales et al., 2010) i antitumorsku aktivnost (Chatterjee et al., 2016). Ipak, ova vrsta je najpoznatija kao jedan od najznačajnijih uzročnika infekcija širom sveta, sa znatnom stopom morbiditeta i mortaliteta (Buhl et al., 2015).

### 1.3. *P. aeruginosa* kao uzročnik infekcija

*P. aeruginosa* zauzima vodeće mesto među Gram-negativnim patogenim bakterijama kao uzročnik brojnih akutnih i hroničnih infekcija, naročito kod osoba sa narušenim imunskim sistemom (Bassetti et al., 2018). Glavni je uzročnik smrtnih ishoda kod pacijenata obolelih od cistične fibroze i vodeći nozokomijalni patogen (Moradali et al., 2017). *P. aeruginosa* uzrokuje pojavu unutarbolničkih infekcija povezanih sa upotrebom medicinskih uređaja poput mehaničkih ventilatora, centralnih venskih i urinarnih katetera, kao i infekcija nastalih usled hirurških zahvata i transplantacija. Učestalo se izoluje i iz rana, opekotina, urinarnog trakta i respiratornih puteva (Azam & Khan, 2019). Podaci ukazuju da *P. aeruginosa* uzrokuje 10-15% svih nozokomijalnih infekcija (Shi et al., 2019), dok je taj procenat na odeljenjima intenzivne nege znatno veći i može dostići vrednost od ~29% (Nathwani et al., 2014). Takođe, ovaj patogen u bolničkom okruženju može kontaminirati sanitarne prostorije, vlažne medicinske uređaje, vodene rastvore, sapune i deterdžente. Sudopere i prenosivi endoskopi predstavljaju najznačajnije rezervoare transmisije *P. aeruginosa* (Tümmeler, 2019). Za široku rasprostranjenost ovog patogena u zdravstvenim ustanovama zaslužna je njegova transmisija sa pacijenta na pacijenta, sposobnost dugog opstanka na živim i neživim površinama, kao i otpornost na dezinficijense (Russotto et al., 2015).

Pored nozokomijalnih oboljenja, *P. aeruginosa* je uzročnik infekcija i van bolničkih ustanova, ali u znatno manjoj meri. Najčešće opisan tip infekcija poreklom iz vanbolničke sredine uzrokovanih *P. aeruginosa* je nekrotizirajuća pneumonija, bakterijemija i sepsa, koje mogu imati veoma ozbiljne posledice (Hattemer et al., 2013). Osim toga, *P. aeruginosa* može izazvati infekcije uha i oka koje, ukoliko se ne tretiraju pravilno, mogu dovesti do gubitka čula sluha, odnosno vida. Glavni faktori rizika vanbolničkih infekcija izazvanih ovim patogenom su postojanje određenih oboljenja poput dijabetesa, hronične bolesti pluća i bubrega (Prina et al., 2015). Konzumiranje alkohola i cigareta se takođe smatraju značajnim faktorima rizika pojave infekcija uzrokovanih ovom bakterijskom vrstom (Maharaj et al., 2017).

Za izuzetnu patogenost *P. aeruginosa* zaslužni su brojni mehanizmi rezistencije na antibiotike kao i posedovanje čitavog arsenala faktora virulencije (Azam & Khan, 2019). Imajući u vidu sve veću prevalencu rezistencije i neefikasnost antibakterijskih agenasa koji se koriste u tretmanu infekcija izazvanih ovom bakterijom, Američko udruženje za infektivne bolesti (eng. *Infectious Disease Society of America*) pozicioniralo je vrstu *P. aeruginosa* na listu ESKAPE patogena, koji predstavljaju najveću opasnost po javno zdravlje. Akronim ESKAPE čini šest klinički značajnih patogena sa izuzetnim rezistentnim i virulentnim potencijalom: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. (Mulani et al., 2019). Značaj ove bakterijske vrste potvrdila je i Svetska zdravstvena organizacija kada je u izveštaju objavljenom 2017. godine uvrstila *P. aeruginosa* na listu od 12 patogena za koje je urgentno potreban razvoj novih terapeutika (De Oliveira et al., 2020).



#### 1.4. Mehanizmi rezistencije na antibiotike vrste *P. aeruginosa*

Mehanizmi rezistencije na antibiotike kod *P. aeruginosa* mogu biti urođeni, stečeni i adaptivni.

Urođeni mehanizmi rezistencije odnose se na sposobnost bakterijske vrste da umanjuje efikasnost određenog antibiotika kroz posjedovanje urođenih strukturnih ili funkcionalnih karakteristika. *P. aeruginosa* odlikuje značajan nivo urođene rezistencije na antibiotike, najčešće posredstvom mehanizama ograničene propustljivosti spoljašnje ćelijske membrane, ekspresije efluks sistema za izbacivanje antibiotika i enzima koji inaktiviraju antibiotike ( $\beta$ -laktamaze) (Pang et al., 2019). Smanjena propustljivost spoljašnje membrane posredovana je modifikacijama proteina porina, dok efluks pumpe aktivno izbacuju antibiotike van ćelije (Azam & Khan, 2019). *P. aeruginosa* poseduje urođenu rezistenciju na cefalosporine I, II i delimično III generacije, peniciline i makrolide.

Za razliku od urođene, stečena rezistencija uslovljena je prisustvom antibiotika, pri čemu pod selektivnim pritiskom nastaju rezistentne populacije bakterijskih ćelija. Ovaj vid rezistencije kod *P. aeruginosa* posredovan je horizontalnim transferom gena koji nose determinante rezistencije na antibiotike i/ili mutacijama (Munita & Arias, 2016). Bakterija može usvojiti genetičke determinante rezistencije sadržane na plazmidima, integronima, transpozonima i profagima od rezistentnih predstavnika iste ili druge bakterijske vrste (Breidenstein et al., 2011). Rezistencija posredovana mutacijama podrazumeva izmene koje dovode do smanjene propustljivosti membrane, izmene u ciljnim mestima delovanja antibiotika i prekomernu ekspresiju efluks pumpi (Munita & Arias, 2016). Podaci iz literature navode da na ovaj način *P. aeruginosa* može usvojiti gene za rezistenciju na aminoglikozide,  $\beta$ -laktame i karbapeneme (Pang et al., 2019).

Adaptivna rezistencija predstavlja tranzijentnu formu rezistencije uslovljenu prisustvom specifičnih antibiotika ili sredinskih stresora kao što su promene pH, temperature, koncentracije kiseonika i medijuma za rast (Azam & Khan, 2019). Indukovana izmena ekspresije gena i ciljnih mesta delovanja antibiotika prestaje zajedno sa prestankom delovanja spoljašnjih stimulusa koji su tu promenu uslovlili. Posredstvom adaptivnog mehanizma, *P. aeruginosa* može ostvariti rezistenciju na aminoglikozide, fluorohinolone i polimiksine, od kojih je najznačajnije izdvojiti kolistin (Moradali et al., 2017).

Na osnovu širine spektra rezistencije na antibiotike, izolati *P. aeruginosa* kategorisani su u dve grupe - višestruko rezistentne (eng. *multi-drug resistant*, MDR) i ekstremno rezistentne (eng. *extensively drug-resistant*, XDR) izolate. *P. aeruginosa* se smatra jednom od klinički najznačajnijih MDR bakterija jer poseduje izuzetnu sposobnost rezistencije na širok spektar antimikrobnih agenasa posredstvom različitih molekularnih mehanizama, koji su veoma često istovremeno prisutni kod kliničkih izolata. Prema podacima Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (eng. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) za 2016. godinu, 33,9% kliničkih izolata *P. aeruginosa* ispoljilo je rezistentan fenotip na najmanje jednu od grupa antibiotika koje se koriste za nadzor ovog patogena (piperacilin  $\pm$  tazobaktam, fluorohinoloni, ceftazidim, aminoglikozidi, karbapenemi) (Bassetti et al., 2018). Uočena je značajna geografska predisponiranost pojave rezistentnih izolata, te je procenat rezistencije znatno veći u Južnoj i Istočnoj u odnosu na Severnu Evropu.

## 1.5. Faktori virulencije vrste *P. aeruginosa*

Produkcija faktora virulencije predstavlja veoma važnu strategiju preživljavanja patogena, koja im omogućava odbranu od imunskog sistema domaćina i za rezultat ima napredovanje patogeneze, posebno u ranim fazama kolonizacije i akutne infekcije (Moradali et al., 2017). *P. aeruginosa* raspolaže celim arsenalom različitih faktora virulencije koji čine osnovu njegove patogenosti, a koji se na osnovu lokalizacije mogu podeliti na (i) faktore virulencije vezane za površinu ćelije (pili, flagele, fimbrije, lipopolisaharidi); (ii) faktore koji se oslobađaju iz ćelije (egzotoksini, proteaze, pigmenti, ramnolipidi, surfaktanti) i (iii) nekoliko tipova sekrecije (Van Delden, 2004). Međućelijska komunikacija bakterija predstavlja glavni regulator modulacije signala iz spoljašnje sredine i produkcije faktora virulencije, dok sposobnost formiranja biofilma predstavlja faktor virulencije koji integriše sve preostale faktore u jednu celinu, te je ujedno najkompleksniji i najznačajniji virulentni faktor (Moradali et al., 2017).

### 1.5.1. Međućelijska komunikacija bakterija

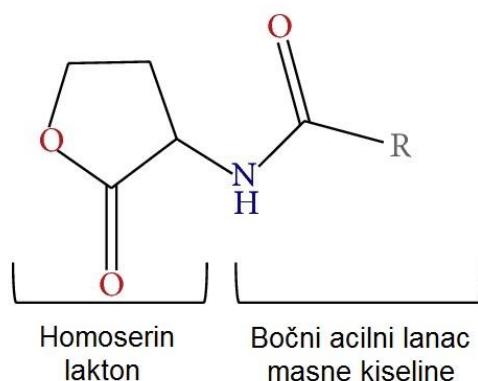
Sve do 70-ih godina XX veka bakterije su smatrane solitarnim, "gluvonemim" organizmima, lišenih sposobnosti komunikacije sa drugim mikroorganizmima. Ovu tvrdnju opovrgao je Nilson (Nealson et al., 1970) ustanovivši da dve morske bakterijske vrste *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* oslobađaju molekule odgovorne za bioluminiscenciju. Nilson je utvrdio da ove bakterije produkuju svetlost samo pri velikoj gustini populacije, ali ne i u razblaženoj suspenziji. Signalni molekul odgovoran za ovu pojavu (autoinducer) kasnije je identifikovan kao N-acil-homoserin lakton (AHL, Eberhard et al., 1981). Potonji nalazi Nilsona i Hejstingsa ukazivali su da se određene bakterije oslanjaju na produkciju, oslobađanje, razmenu i detekciju signalnih molekula kako bi kontrolisale svoje ponašanje u odgovoru na varijacije broja ćelija u bakterijskoj populaciji (Nealson & Hastings, 1979). Više od dve decenije nakon Nilsonovog otkrića da su bakterije socijalni organizmi, smatralo se da je međućelijska signalizacija "anomalija" svojstvena svega malom broju mikroorganizama. Međutim, danas se zna da je ovaj fenomen univerzalna pojava kod gotovo svih do sada opisanih bakterijskih vrsta (Bassler & Losick, 2006) i od suštinske je važnosti za njihovo preživljavanje i interakciju u niši koju naseljavaju (Miller & Bassler, 2001).

Međućelijska komunikacija bakterija, odnosno *quorum sensing* (QS), definisana je kao fenomen koji koriste jednoćelijski organizmi kako bi koordinisali obrazac ponašanja u cilju prilagođavanja uslovima životne sredine, kao i u svrhu međusobne kompeticije i interakcije sa višećelijskim organizmima (Waters & Bassler, 2005). Većina procesa pod kontrolom QS sistema je nefunkcionalna u slučaju delovanja pojedinačne bakterijske ćelije i zadobija aktivnost tek pod simultanim delovanjem cele bakterijske populacije. Fiziološki procesi pod kontrolom QS sistema su veoma raznoliki (Ng & Bassler, 2009; Grandclément et al., 2016) i podeljeni su u četiri funkcionalne kategorije:

- održavanje i proliferacija ćelijske kulture (produkcija egzoenzima, sinteza siderofora, sporulacija, otpornost na kiselu sredinu);
- ponašanje (formiranje i disperzija biofilma, pokretljivost, adhezija);
- horizontalni transfer gena (kompetencija, konjugacija plazmida);

- interakcija sa drugim mikroorganizmima i domaćinom (produkcija faktora virulencije i egzopolisaharida, bioluminiscencija, produkcija antibiotika, faktori odgovorni za kolonizaciju domaćina).

Posredstvom međucelijske komunikacije bakterije sinhronizuju ponašanje na nivou cele populacije i na taj način funkcionišu kao višecelijski organizmi. Ono što karakteriše ovakav vid komunikacije su brojne sličnosti i razlike specifične za određenu vrstu. Sličnosti se objašnjavaju time što je komunikacija fundamentalna osobina bakterija, a razlike postoje jer svaki sistem teži da optimizuje preživljavanje u nišama karakterističnim za pojedine vrste bakterija. Tipovi signala, receptori, mehanizmi signalne transdukcije i ciljne mete svakog QS sistema odražavaju jedinstven biološki sistem karakterističnim za svaku bakterijsku vrstu (Waters & Bassler, 2005). Bez obzira na različite molekularne mehanizme i regulatorne komponente koje kontrolišu međucelijsku komunikaciju bakterija, u osnovi svih do sada opisanih QS sistema nalaze se tri principa: (i) članovi bakterijske zajednice proizvode signalne molekule autoinducere (AI), koji su pri niskoj gustini populacije prisutni u koncentraciji ispod praga detekcije, a kada gustina populacije dostigne odgovarajući nivo, bakterije detektuju akumulaciju AI koja je iznad minimalnog praga stimulatorne koncentracije, menjajući ekspresiju gena i ponašanje u odgovoru na te signale; (ii) detekcija AI odvija se posredstvom receptora za AI koji se nalaze u citoplazmi ili na ćelijskoj membrani; (iii) AI ostvaruju dvostruku ulogu - vezivanjem za receptore aktiviraju ekspresiju gena odgovornih za kooperativno ponašanje i aktiviraju produkciju novih AI, čime se stvara pozitivna povratna sprega koja omogućava sinhrono ponašanje ćelija u bakterijskoj populaciji (Seed et al., 1995; Rutherford & Bassler, 2012).



**Slika 1.** Struktura N-acil-homoserin laktone. Slika preuzeta i modifikovana iz Waters & Bassler, 2005.

Većina Gram-negativnih proteobakterija komunicira posredstvom hemijskih signalnih molekula N-acil-homoserin laktone (Manefield & Turner, 2002). Strukturu AHL čini laktonski prsten i acilni lanac dužine od 4 (*P. aeruginosa*) do 20 (*Rhodovulum sulfidophilum*) atoma ugljenika (Slika 1) (Fuqua et al., 2001; Arashida et al., 2018) koji su međusobno povezani amidnom vezom. Bočni acilni lanac može biti modifikovan na C3 atomu (okso ili hidroksi supstituent) ili nositi nesaturisane dvostruke veze (Thiel et al., 2009). Razlike u dužini, saturaciji i supstitucijama ovih lanaca ključne su za signalnu specifičnost (Churchill & Chen, 2011). AHL-posredovana QS mreža sačinjena je od dvokomponentnog sistema koji se sastoji od autoinducer sintaze i transkripcionog regulatora (De Kievit et al., 2002; Gould et al., 2004). Autoinducer sintaza koristi S-adenozil metionin (SAM) kao

supstrat, pri čemu se vrši acilacija SAM i laktonizacija metioninskog ostatka i kao produkt nastaje AHL (Moré et al., 1996; Ng & Bassler, 2009).

Produkovani AHL difunduje kroz ćeliju posredstvom pasivnog i aktivnog transporta (Kaplan & Greenberg, 1985; Pearson et al., 1999). Nakon što koncentracija AHL dostigne određenu gustinu - kritičnu koncentraciju, sledi njihovo vezivanje za citoplazmatski transkripcioni regulator (receptor, R). Uspostavljanje kompleksa AHL-transkripcioni regulator (AI/R) omogućava simultanu aktivaciju transkripcije gena pod kontrolom QS sistema kod individualnih ćelija koje čine bakterijsku populaciju (Guo et al., 2020). QS sistem posredovan ovim tipom hemijskih signala prevashodno koriste bakterije za intraspecijsku komunikaciju kada postoji ekstremna specifičnost između receptora i njihovog prepoznavanja AHL molekula.

Budući da u prirodi mikroorganizmi veoma retko žive u monokulturi, već su uglavnom deo polimikrobne zajednice, interakcije među članovima te zajednice nužne su za njeno održavanje i razvoj. Pored prethodno opisane razmene signalnih molekula unutar članova iste bakterijske vrste, bakterije su sposobne da "prisluškuju" komunikaciju drugih mikroorganizama, modulišući svoje ponašanje kao odgovor na hemijske signale koje same ne sintetišu. Autoinducer 2 opisan je kao univerzalni molekul za interspecijsku komunikaciju i kod Gram-pozitivnih i kod Gram-negativnih bakterijskih vrsta (Schauder & Bassler, 2001). Pored autoinducera 2, ulogu u interspecijskoj komunikaciji imaju difuzabilni signalni faktori, autoindukujući peptidi i subinhibitorne koncentracije antibiotika (Linares et al., 2006; Ryan & Dow, 2008). Ovaj vid komunikacije koriste patogene bakterije kako bi posredstvom kooperativnog ili kompetitivnog ponašanja izvršile inicijalnu kolonizaciju domaćina. Pokazano je da prilikom respiratornih infekcija, kokultivacija *P. aeruginosa* i *S. aureus* uz tretman tobramicinom dovodi do nadmoći *P. aeruginosa* usled njegove sposobnosti da sintetiše sekundarne metabolite koji mu omogućavaju komunikaciju sa drugim mikroorganizmima i formiranje biofilma (Nguyen & Oglesby-Sherrouse, 2016; Banerji et al., 2020).



Prvi opisani QS sistem vrste *P. aeruginosa*, *las* sistem, čine tri komponente: *lasI* gen koji kodira LasI sintazu; *lasR* kodira transkripcioni aktivator LasR i *rsaL* odgovoran za sintezu transkripcionog represora (RsaL) *lasI* gena. Hemijski molekul *las* signalnog puta N-3-okso-dodekanoil homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) formira kompleks sa LasR transkripcionim aktivatorom, nakon čega se kompleks vezuje za *las*-boks koji se nalazi u promotorskoj sekvenci ciljnog gena (*lasI*), i dovodi do aktivacije njegove transkripcije (Whiteley & Greenberg, 2001). Na ovaj način 3-okso-C12-HSL indukuje sopstvenu sintezu i uspostavlja mehanizam pozitivne povratne sprege. Transkripcioni aktivator LasR je inicijalno identifikovan kao ključni regulator ekspresije *lasB* gena koji kodira metaloproteinazu elastazu (Gambello et al., 1993). Pored elastaze, *las* sistem kontroliše sintezu egzotoksina A i alkalne proteaze (Castillo-Juárez et al., 2015). Osim što učestvuje u aktivaciji transkripcije *lasI* gena, LasR kontroliše ekspresiju RsaL transkripcionog represora. Vezivanje RsaL za bidirekcionu *rsaL-lasI* promotor inhibira ekspresiju oba gena, čime generiše negativnu povratnu spregu koja neutrališe prethodno pomenutu pozitivnu povratnu spregu i na taj način održava koncentraciju 3-okso-C12-HSL u ravnoteži. Utvrđeno je takođe da RsaL inhibira ekspresiju gena uključenih u biosintezu piocijanina i cijanovodonične kiseline (Rampioni et al., 2007).

Drugi QS sistem kod *P. aeruginosa*, *rhl* sistem, prevažodno je otkriven kao mehanizam odgovoran za sintezu ramnolipida (Brint & Ohman, 1995) a potom je ustanovljeno da kontroliše produkciju drugih egzoprodukata: elastaze, hemolizina, hitinaze, cijanovodonične kiseline i piocijanina (Whiteley et al., 1999; Pessi & Haas, 2000). Signalni molekul ovog sistema je N-butiril-homoserin lakton (C4-HSL), a njegova sinteza je pod kontrolom *rhlI* gena koji deli značajnu homologiju sa *luxI* i *lasI* genima (Ochsner & Reiser, 1995). Po formiranju dimera C4-HSL:RhlR dolazi do njegovog vezivanja za *rhl*-boks i aktivacije transkripcije ciljnih gena što za posledicu ima stvaranje mehanizma pozitivne povratne sprege kao i kod prethodno opisanog *las* sistema (Schuster & Greenberg, 2007). Bitno je pomenuti da *rhl* sistem ostvaruje ulogu u aktivaciji transkripcije RpoS sigma faktora koji se smatra glavnim regulatorom bakterijskog odgovora na stres (Schuster et al., 2004). Takođe, *las* i *rhl* QS sistemi igraju glavnu ulogu u adaptaciji i odgovoru na stresore iz spoljašnje sredine kao što su teški metali, soli, toplotni i oksidativni stres (García-Contreras et al., 2015).

Iako su 4-hinoloni otkriveni tokom 40-ih godina XX veka, i potom proučavani zbog svojih antibakterijskih svojstava, uloga ovih molekula u signalizaciji otkrivena je tek 50 godina kasnije kada je Pesci sa saradnicima (Pesci et al., 1999) prvi put ustanovio da 4-hinoloni *P. aeruginosa* PAO1 učestvuju u međucelijskoj komunikaciji. Treći QS signalni molekul *P. aeruginosa* označen kao PQS (eng. *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal) po svojoj strukturi je 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolon i pod kontrolom je *pqsA* gena (Bredenbruch et al., 2005). Po dostizanju praga koncentracije PQS se vezuje za receptor PqsR (označen i kao MvfR), aktivira ekspresiju ciljnih gena što za posledicu ima sintezu PQS i piocijanina (Cao et al., 2001; Déziel et al., 2005). Ovaj QS sistem je od suštinske važnosti za formiranje biofilma, pokretljivost, sintezu piocijanina, elastaze, ramnolipida i lektina (Diggle et al., 2003; Lee & Zhang, 2015). Na model sistemima biljaka i životinja pokazano je da mutacije u *pqs* sistemu dovode do značajne redukcije virulentnog potencijala *P. aeruginosa* (Rampioni et al., 2010). Pored uloge u kontroli ekspresije faktora virulencije, PQS ima izuzetan značaj u metabolizmu gvožđa kod bakterija (Diggle et al., 2007) i ispoljava proapoptotska i imunomodulatorna svojstva u eukariotskim sistemima (Hänsch et al., 2014; Tettmann et al., 2016).

Najskorije identifikovan četvrti sistem međucelijske komunikacije *P. aeruginosa* označen je kao *iqs* (eng. *integrated quorum sensing*) sistem i ostvaruje ulogu u integraciji signala iz spoljašnje sredine sa kompleksnom QS mrežom (Lee et al., 2013). IQS signalni molekul ovog sistema strukturno

je okarakterisan kao 2-(2-hidroksifenil)-tiazol-4-karbaldehid (Lee & Zhang, 2015). Status ovog QS sistema još uvek nije u celosti razjašnjen, osim što se zna da ima ulogu u modulaciji patogeneze *P. aeruginosa* (Li et al., 2018).

Sva četiri sistema međucelijske komunikacije *P. aeruginosa* organizovana su u složenu hijerarhijsku mrežu (Slika 2). Na vrhu ove hijerarhijske lestvice pozicioniran je *las* sistem koji koordiniše preostala tri (Lee & Zhang, 2015), dok svaki sistem ima sposobnost autoregulacije po principu pozitivne povratne sprege. Takođe, *rhl* sistem se nalazi najniže na lestvici i pod kontrolom je kako *las*, tako i *pqs* i *iqs* sistema, te predstavlja glavni komandni čvor i mesto ukrštanja ostalih signalnih puteva. Eksperimentalno je utvrđeno da aktivacija QS sistema *P. aeruginosa* zavisi od faze rasta bakterijske kulture, pri čemu se u lag i ranoj eksponencijalnoj fazi aktiviraju *las* i *rhl*, dok se *pqs* sistem aktivira u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta (Choi et al., 2011; Moradali et al., 2017). Odnosi između ova četiri QS sistema su znatno kompleksniji ukoliko se uzme u obzir da, osim što mogu biti regulisani međusobno, takođe mogu biti aktivirani posredstvom Vfr i GacS-GacA transkripcionih regulatora (Venturi, 2006) kao i delovanjem sredinskih faktora kao što su gladovanje (Schafhauser et al., 2014), niska koncentracija kiseonika (Schuster & Greenberg, 2006), nedostatak fosfata i gvožđa (Lee et al., 2013; Oglesby et al., 2008) i faktorima poreklom od domaćina (Lee & Yoon, 2017). Ova otkrića naglašavaju važnost faktora životne sredine u modulaciji QS sistema i njihove plastičnosti u iskorišćavanju nastalih promena u korist bakterijskih patogena.

### 1.5.3. Ekstracelularni faktori virulencije

#### 1.5.3.1. Elastaze

Sposobnost *P. aeruginosa* da razgradi elastin smatra se glavnom odrednicom patogeneze tokom akutne infekcije (Van Delden, 2004). Razgradnja elastina, izuzetno značajne gradivne komponente tkiva pluća, odvija se usklađenom aktivnošću dva enzima LasB i LasA elastaze (Gellatly & Hancock, 2013). Sinteza ovih enzima je pod kontrolom *las* QS sistema i sekrecionog sistema tipa II (De Kievit & Iglewski, 2000). Oba enzima pripadaju superfamiliji cink-metaloproteinaza i imaju sposobnost razgradnje brojnih proteina uključujući elastin, kolagen i proteine surfaktante prisutne na površini plućnog epitela (Sadikot et al., 2005). Kao posledica elastazne aktivnosti, dolazi do narušavanja integriteta epitelne barijere, slabljenja imunskog sistema domaćina, kao i nemogućnosti zarastanja rana. Novija istraživanja pokazala su da elastazna aktivnost predstavlja važan marker ozbiljnosti infekcije kod pacijenata sa pseudomonasnom bakterijemijom (Juan et al., 2017). Pokazano je, takođe, da su *lasB* mutanti *P. aeruginosa* mnogo osetljiviji na fagocitozu i imaju redukovani virulentni potencijal (Kuang et al., 2011).

### 1.5.3.2. Piocijanin

Plavo-zelena boja bakterijskih kolonija *P. aeruginosa* potiče od pigmenta piocijanina, značajnog faktora virulencije iz grupe fenazina (Lau et al., 2004). Sinteza ovog sekundarnog metabolita je pod kontrolom *pqs* QS sistema, a njegov transport u lokalno okruženje posredovan je sekrecionim sistemom tipa II (Hall et al., 2016). S obzirom da jedino *P. aeruginosa* ima sposobnost sinteze ovog pigmenta, piocijanin predstavlja veoma značajan marker koji se koristi u brznoj dijagnostici ovog patogena (Nadal Jimenez et al., 2012). Pored mnogih uloga koje piocijanin ostvaruje kao signalni molekul u stacionarnoj fazi rasta i u sazrevanju biofilma (Dietrich et al., 2006), njegova najistaknutija uloga je izazivanje oksidativnog stresa u ćelijama domaćina (Das et al., 2016). Kao posledica delovanja reaktivnih kiseoničnih vrsta posredstvom piocijanina na ćelije domaćina, dolazi do produkcije mukusa u plućima, sprečavanja transporta elektrona u mitohondrijama, apoptoze neutrofila, narušavanja produkcije citokina, redukcije aktivnosti makrofaga i indukcije proinflamacijske sredine (Bianchi et al., 2008; Hall et al., 2016). Smatra se, takođe, da je ozbiljnost pseudomonasne infekcije u direktnoj sprezi sa koncentracijom piocijanina u sputumu pacijenata obolelih od cistične fibroze (Hunter et al., 2012).

### 1.5.3.3. Ramnolipidi

Ramnolipidi pripadaju grupi glikolipida hemolizina, a njihova sinteza je pod kontrolom *las* i *rhl* QS sistema (Van Delden, 2004). Produkcija ramnolipida odvija se tokom kasne ekspanzionalne i stacionarne faze rasta bakterijske kulture (Dusane et al., 2010), a uslovljena je i faktorima spoljašnje sredine i smanjenom dostupnošću hranljivih materija (Chrzanowski et al., 2012). Ovi biosurfaktanti ostvaruju nekoliko značajnih uloga u invaziji tkiva domaćina uključujući razgradnju lipida, narušavanje funkcije cilijarnog plućnog epitela, nekrozu ćelija domaćina i eliminaciju neutrofila (Jensen et al., 2010). Pokazano je, takođe, da ramnolipidi ostvaruju izuzetno važnu ulogu u nekoliko faza formiranja biofilma uključujući formiranje mikrokolonija, održavanje strukture kanala, formiranje pečurkaste arhitekture biofilma kao i njegovo rasejavanje (Davey et al., 2003; Pamp & Tolker-Nielson, 2007; De Kievit, 2009).

### 1.5.4. Biofilm

Tokom istorije mikrobiologije, mikroorganizmi su prevashodno smatrani planktonskim, slobodnoživućim organizmima. Pojavu biofilma prvi je zapazio Anton van Levenhuk kao formirane plake na površini zuba. Međutim, tek je primenom elektronske mikroskopije u drugoj polovini XX veka, postalo moguće detaljno ispitati strukturu biofilma (Donlan, 2002). Costerton sa saradnicima (Costerton et al., 1978) prvi je izneo teoriju o mehanizmima formiranja biofilma na različitim površinama i prednostima ovakve organizacije bakterijskih ćelija i iskorišćenosti niše.

Biofilm po definiciji predstavlja visoko organizovanu zajednicu mikroorganizama pričvršćenih za površinu i uronjenih u ekstracelularni matriks koji sami produkuju (Høiby et al., 2011). Može se formirati kako na živim, tako i na neživim površinama (Sharma et al., 2014). Biofilm se, pored bakterijske populacije, sastoji od ekstraćelijskog matriksa koga čine polimeri kao što su



egzopolisaharidi (EPS), ekstracelularna DNK (eDNK), RNK, lipidi, proteini i amiloidni agregati (Wingender et al., 2001; Sharma et al., 2019). U formiranju biofilma može učestvovati jedna ili veći broj bakterijskih vrsta. Procenjuje se, naime, da dentalni biofilm sadrži preko 500 različitih vrsta bakterija. Nasuprot tome, u poodmaklom stadijumu bolesti, u plućima pacijenata obolelih od cistične fibroze biofilm formira jedino *P. aeruginosa* (Mah & O'Toole, 2001; Coutinho et al., 2008).

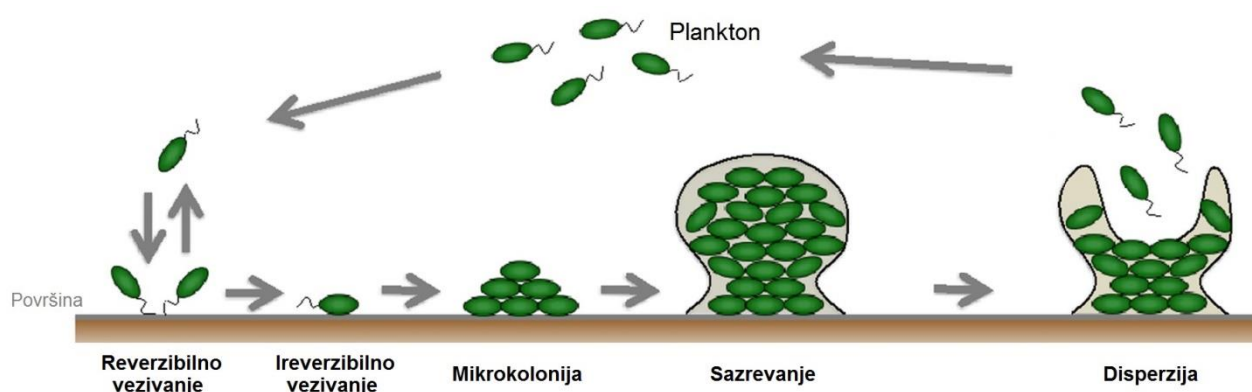
Zajednice mikroorganizama u biofilmu razlikuju se od planktonskih mikroorganizama na osnovu brzine rasta i ekspresije gena (transkripcije i translacije), usled toga što život u ovakvoj mikrosredini odlikuje povećana osmolarnost, ograničena dostupnost hranljivih materija i znatno veća gustina raznolikih bakterijskih vrsta (Sharma et al., 2019). Formiranje trodimenzionalne strukture biofilma veoma je dinamičan proces i zahteva uzajamno delovanje heterogenih bakterijskih zajednica. Prostorna i vremenska promenljivost arhitekture biofilma javlja se kao posledica delovanja različitih spoljašnjih i unutrašnjih faktora (Donlan, 2002). Povoljnosti koje obezbeđuje život u ovoj zajednici u odnosu na planktonsku formu su zaštita od delovanja faktora spoljašnje sredine kao što su isušivanje, delovanje antimikrobnih supstanci i zaštita od fagocitoze, oksidativnog stresa, kompeticije između različitih mikroorganizama kao i olakšane međućelijske komunikacije, te biofilmovi ujedno predstavljaju idealnu nišu za razmenu naslednih informacija (Leid, 2009; Wilkins et al., 2014; Olsen, 2015). Smatra se da su bakterije u biofilmu i do hiljadu puta tolerantnije na delovanje antibiotika u odnosu na planktonsku formu (Sharma et al., 2019). Procesi koji se odvijaju unutar ovih složenih struktura su pod direktnom kontrolom QS sistema (Solano et al., 2014).

Sposobnost formiranja biofilma predstavlja jednu od najznačajnijih virulentnih karakteristika *P. aeruginosa* i zaslužna je za uspostavljanje hroničnih infekcija, stoga direktno utiče na progresiju bolesti i dugotrajnu perzistenciju (Moradali et al., 2017). Zahvaljujući tome, *P. aeruginosa* dominira u polimikrobnoj zajednici starijih osoba obolelih od cistične fibroze, istiskujući ostale članove te zajednice (McDaniel et al., 2015). Prelaskom iz planktonske forme u formu biofilma, *P. aeruginosa* gubi pokretljivost i zaustavlja produkciju faktora virulencije odgovornih za izazivanje akutnih infekcija i formira agregate ćelija - mikrokolonije uronjene u ekstraćelijski matriks (Lee & Yoon, 2017).

*P. aeruginosa* predstavlja model sistem za proučavanje biofilmova kod Gram-negativnih bakterija. Formiranje biofilma je fino regulisan, višestepeni proces koji čine sledeći događaji: (i) adsorpcija makro i mikromolekula, vezivanje bakterija za površinu i oslobađanje ekstracelularnih supstanci; (ii) formiranje mikrokolonija i sazrevanje biofilma i (iii) rasejavanje (disperzija) (Slika 3) (Müsken et al., 2010).

**Vezivanje bakterija za površinu** je početna a samim tim i najznačajnija faza u formiranju biofilma, jer podrazumeva prelazak sa planktonskog načina života na život u biofilmu. Prvi korak u vezivanju za površinu je reverzibilan (O'Toole & Kolter, 1998). Vezivanje se odvija zahvaljujući ćelijskim strukturama koje bakterijama omogućavaju kretanje - flagelama, fimbijama i pilima (Toyofuku et al., 2016). U ovom koraku bakterije donose odluku da li se vraćaju planktonskom načinu života ili se ireverzibilno vezuju za površinu (Petrova & Sauer, 2012). Sekundarni glasnici ciklični di-guanozin monofosfat (c-di-GMP) i ciklični adenzin monofosfat (cAMP) odgovorni su za tranziciju iz reverzibilnog u ireverzibilno vezivanje ćelija *P. aeruginosa* za površinu (Ono et al., 2014) a sami su pod kontrolom delovanja spoljašnjih faktora (McDonough & Rodriguez, 2011).

**Sazrevanje biofilma.** Nakon uspostavljanja ireverzibilnih veza sa površinom, bakterije započinju deobu i međućelijsku komunikaciju, te dolazi do formiranja mikrokolonija i proizvodnje ekstracelularnog matriksa kao najvažnijeg događaja u ovoj fazi (Limoli et al., 2015). Ekstracelularni matriks kreira nišu koja omogućava intenzivnu međućelijsku komunikaciju, i ujedno predstavlja rezervoar hranljivih materija i energije neophodnih za rast, te istovremeno štiti ćelije od nepovoljnih uslova (Flemming & Wingender, 2010; Moradali et al., 2017). On ujedno čini 90% suve materije biofilma. U ovoj fazi dolazi do formiranja kanala koji služe za povezivanje delova biofilma, omogućavaju transport vode i mineralnih materija kao i uklanjanje produkata metabolizma (Hall-Stoodley et al., 2004). Mnogobrojne studije pokazale su da je struktura biofilma veoma dinamična i uslovljena promenama spoljašnje sredine (Toyofuku et al., 2016) i kod *P. aeruginosa* varira od pečurkaste koja se formira u uslovima bogatim kiseonikom, do mrežaste trodimenzionalne strukture koja je karakteristična za anoksično stanje (Yawata et al., 2008). U kasnijim fazama sazrevanja biofilma, bakterijske ćelije podležu fiziološkim promenama koje ih čine znatno rezistentnijim na delovanje spoljašnjih faktora i antibiotika (Lee & Yoon, 2017).



**Slika 3.** Faze formiranja biofilma vrste *P. aeruginosa*. Slika preuzeta i modifikovana iz Toyofuku et al., 2016.

**Disperzija (rasejavanje)** predstavlja završni korak u razvoju biofilma. Iz zrelog biofilma, neke bakterije rasejavanjem prelaze u planktonsku formu, dok se druge pričvršćuju za novu površinu. Dakle, rasejavanje nije samo završna faza životnog ciklusa biofilma, već ujedno predstavlja početak novog ciklusa. Mehanizam rasejavanja može biti pasivan, usled delovanja fizičkih sila i aktivan, koji se javlja kao posledica pokretljivosti ćelija unutar biofilma i degradacije matriksa (McDougald et al., 2011). Na proces rasejavanja utiču i sredinski faktori (dostupnost hranljivih materija i kiseonika, pH, hemijske materije, surfaktanti) kao i veličina i starost mikrokolonija (Kim & Lee, 2016; Lee & Yoon, 2017). Kod većine patogenih bakterija uključujući i *P. aeruginosa*, rasejavanje biofilma igra značajnu ulogu u transmisiji bakterija iz životne sredine na domaćina (čovjek, životinje), te u pogoršanju i širenju infekcije unutar domaćina (Kaplan, 2010).

## 1.6. Terapija zasnovana na inhibiciji patogenosti bakterija - antivirulentna terapija

Otkriće antibiotika smatra se najvećim događajem na polju medicine XX veka. Zahvaljujući uvođenju antibiotika u kliničku praksu, moderna medicina je drastično promenila svoj tok i spasila nebrojeno mnogo ljudskih života, te znatno produžila prosečan životni vek čoveka. Pored lečenja infekcija, upotrebom antibiotika omogućene su brojne medicinske intervencije, poput lečenja raka, transplantacije organa i operacija na otvorenom srcu (Hutchings et al., 2019). Nažalost, zlatna era antibiotika okončana je nekontrolisanom pojavom izolata među klinički značajnim bakterijskim vrstama rezistentnih na sve trenutno dostupne klase antibiotika (Muñoz-Cazares et al., 2018). Shodno tome, danas su mogućnosti lečenja pojedinih infekcija postale vrlo ograničene ili čak nedostupne, a postoje i infektivne bolesti, čiji su izazivači bakterije, koje su gotovo neizlečive konvencionalnom antibiotskom terapijom. Prema izveštajima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Center for Disease Control and Prevention*), bakterijska rezistencija na antibiotike jedan je od najznačajnijih uzroka morbiditeta i mortaliteta širom sveta (Borges & Simões, 2019). Pored toga, usled ograničenih mogućnosti upotrebe antibiotika, pribegava se povećavanju njihovih doza ili primeni kombinovane antibiotske terapije, koja ostavlja značajne posledice po zdravlje ljudi. Još više zabrinjava činjenica da u poslednje tri decenije u kliničku praksu nije uvedena nijedna nova klasa antibiotika, te su svi trenutno dostupni antibiotici na tržištu derivati starijih generacija (Fernandes & Martens, 2017). Zbog toga postoji hitna potreba za razvojem novih strategija koje bi obezbedile održivu i dugoročnu efikasnost u borbi protiv rezistentnih patogenih bakterija.

Poznato je da tradicionalni antibiotici ciljaju vitalne ćelijske procese visoko konzervisane među bakterijama, namećući snažan selektivni pritisak, što za posledicu ima razvoj mehanizama rezistencije, a osim toga često uzrokuju oštećenja i/ili disbiozu mikrobiote asocirane sa domaćinom (Heras et al., 2015). Jedna od predloženih novih strategija kao metu ima ćelijske procese bakterija odgovorne za virulenciju i patogenost, te je ova strategija stoga nazvana "antivirulentna" ili "antipatogena" terapija. Za razliku od primene antibiotika, lekovi kojima se cilja virulencija patogena mogu imati prednost u pogledu kontrole infekcija. Pored toga, ovaj pristup vodi ka znatnom smanjenju selektivnog pritiska i samim tim manjoj mogućnosti razvoja rezistencije. S obzirom da su antivirulentni agensi specifični za patogene, očekuje se da će oni imati zanemariv efekat na komensalne bakterije (Baldelli et al., 2020). Glavnu metu antivirulentne strategije predstavlja QS sistem koji koordiniše produkciju faktora virulencije i invaziju tkiva domaćina, te samim tim leži u osnovi patogenosti.

Otkriće fenomena utišavanja međućelijske komunikacije bakterija omogućilo je razvoj antivirulentne terapije (Grandclément et al., 2016). Ovaj fenomen, nazvan još i *quorum quenching* (QQ), prvi put je opisan 2000. godine kada je Dong sa saradnicima (Dong et al., 2000) identifikovao enzim AiiA laktonazu poreklom iz *Bacillus* sp. 240B1 soja koja je pokazala izuzetnu efikasnost u smanjenju virulentnog potencijala biljnog patogena *Erwinia carotovora*. Utišavanje međućelijske komunikacije bakterija vrši se ciljanjem tri glavne mete koje predstavljaju tri najvažnija procesa ili molekula QS sistema: sintezu signalnih molekula, same signalne molekule i njihove receptore (Chan et al., 2016). Do danas su opisani brojni QQ mehanizmi koji se zasnivaju na prirodni molekula, načinu delovanja i ciljnim metama (Grandclément et al., 2016). Na osnovu svoje prirode QQ molekuli su podeljeni na inhibitore *quorum sensing*-a (QSI, mali molekuli neproteinske prirode) i *quorum quenching* enzime (QQE, makromolekuli proteinske prirode).

Termini *quorum quenching* i *quorum sensing* inhibitori prvi put su upotrebljeni kako bi se njima opisala enzimska degradacija AHL signala i inhibicija QS malim molekulima antagonistima (Dong et al., 2001). Kako bi se izbegla semantička zabuna, termin *quorum quenching* koristi se u najopštijoj konotaciji kako bi se opisala interferencija sa QS sistemom, uključujući QS inhibitore (QSI) i QQ enzime.

### 1.6.1. Mali molekuli utišivači međucelijske komunikacije bakterija (QSI)

QSI čine veoma raznoliku grupu molekula koji imaju sposobnost inaktivacije AI sintaza i kompetitivnog vezivanja/strukturnih modifikacija receptora autoinducera. U literaturi je opisano mnoštvo QSI molekula poreklom iz veoma različitih organizama uključujući mikroorganizme, gljive, biljke i životinje iz slatkovodnih, morskih i zemljišnih ekosistema (Koh et al., 2013; Montgomery et al., 2013; Grandclément et al., 2016). Pored prirodnih, opisani su i brojni sintetički QSI molekuli (Kalia, 2013; Rémy et al., 2018) Međutim, iako mnogi organizmi i ekstrakti pokazuju QSI aktivnost, aktivna jedinjenja su u potpunosti okarakterisana u veoma malom broju slučajeva. Biohemijska priroda QSI je vrlo raznolika, i osim strukturnih analoga signalnih molekula, koji uglavnom deluju kao kompetitivni inhibitori, ne postoji direktna korelacija između hemijske strukture ili funkcionalne grupe QSI i njihovih ciljnih aktera iz QS sistema (Grandclément et al., 2016). Mada su do sada identifikovani brojni bakterijski sojevi producenti QSI koji pripadaju različitim rodovima kao što su *Bacillus*, *Halobacillus*, *Alteromonas* i *Pseudomonas* (Nithya et al., 2010; Nithya et al., 2011; Bobadilla Fazzini et al., 2013), svega nekoliko QSI je strukturno okarakterisano uključujući feniletamid i ciklo-L-prolil-L-tirozin (Teasdale et al., 2011; Saurav et al., 2017).

Najveći broj identifikovanih QSI je poreklom iz biljaka, te se smatra da su na ovaj način biljke tokom evolucije razvile odbrambene mehanizme kako bi se zaštitile od patogenih bakterija. Ekstrakti belog luka, šargarepe, graška, paprike i kamilice pokazali su izuzetnu efikasnost u utišavanju međucelijske komunikacije klinički relevantnih bakterijskih vrsta, inhibirajući formiranje biofilma i smanjujući njihov patogeni potencijal (Asif & Imran, 2019).

**Inhibitori sinteze signalnih molekula.** Sprečavanje produkcije signalnih molekula podrazumeva inhibiciju sinteze prekursora ili same aktivnosti autoinducer sintaze. AHL se sintetišu iz dva prekursora, SAM i proteina nosača acil grupe (ACP, eng. *acyl carrier protein*). S obzirom da su SAM i ACP esencijalni metaboliti, potpuna inhibicija njihove sinteze je letalna za bakterije. Pokazano je da triklosan pri subletalnim koncentracijama inhibira sintezu AHL (Grandclément et al., 2016). Aktivnost Lux sintaze i njenih homologa može biti inhibirana krajnjim produktima, intermedijerima reakcije i supstratnim analogima. Butiril-SAM i sinefungin, strukturni analozi SAM blokiraju sintezu AHL (Chan et al., 2015). Pretragom hemijskih biblioteka pronađeni su kompetitivni inhibitori AHL - J8-C8 koji deluje na C8-HSL (N-oktanoil homoserin lakton) sintazu i derivat triptofana indol-3-sirćetna kiselina (biljni hormon auksin) koji blokira AHL sintazu poreklom iz *Burkholderia mallei* (Chung et al., 2011; Christensen et al., 2013). U literaturi postoji mnoštvo podataka o analogima i strukturnim inhibitorima *pqs* sistema *P. aeruginosa* (Chan et al., 2015). Storz i saradnici (Storz et al., 2012) identifikovali su novu klasu PqsD inhibitora koji značajno smanjuje koncentraciju PQS prekursora i blokira formiranje biofilma kod *P. aeruginosa*.

**Inhibitori transporta i razmene QS signalnih molekula.** Do sada su opisani različiti mehanizmi koji doprinose smanjenju ili potpunom blokiranju transporta QS signalnih molekula. Neki od identifikovanih molekula imaju ulogu sekvestera autoinducera. Pokazano je da antitela ostvaruju vrlo efikasno delovanje u sekvestraciji QS signala kod *S. aureus* i 3-okso-C12-HSL kod *P. aeruginosa* (Park et al., 2007; Kaufmann et al., 2006).

**Inhibitori percepcije QS signala.** Najveći broj QSI molekula identifikovani su kao antagonisti QS signala. Svoju ulogu ostvaruju tako što sprečavaju vezivanje QS signala za receptor i/ili modifikuju konformaciju kompleksa signal-receptor, blokirajući njegovu dimerizaciju ili interakciju sa odgovarajućim DNK regionom. Različiti prirodni i sintetički AHL analozi poput tiolaktona, laktama, izotiocijanata i halogenih furanona blokiraju *rhl* QS sistem *P. aeruginosa* (McInnis & Blackwell, 2011; Malladi, et al., 2011; Jakobsen et al., 2012). Ustanovljeno je, takođe, da farnezol poreklom iz gljive *Candida albicans* inhibira produkciju PQS signalnog molekula *P. aeruginosa* tako što se vezuje za PqsR i dovodi do konformacione modifikacije receptora čime je sprečeno njegovo vezivanje za promotorsku sekvencu *pqsA* gena (Hornby et al., 2001).

### 1.6.2. Quorum quenching enzimi (QQE)

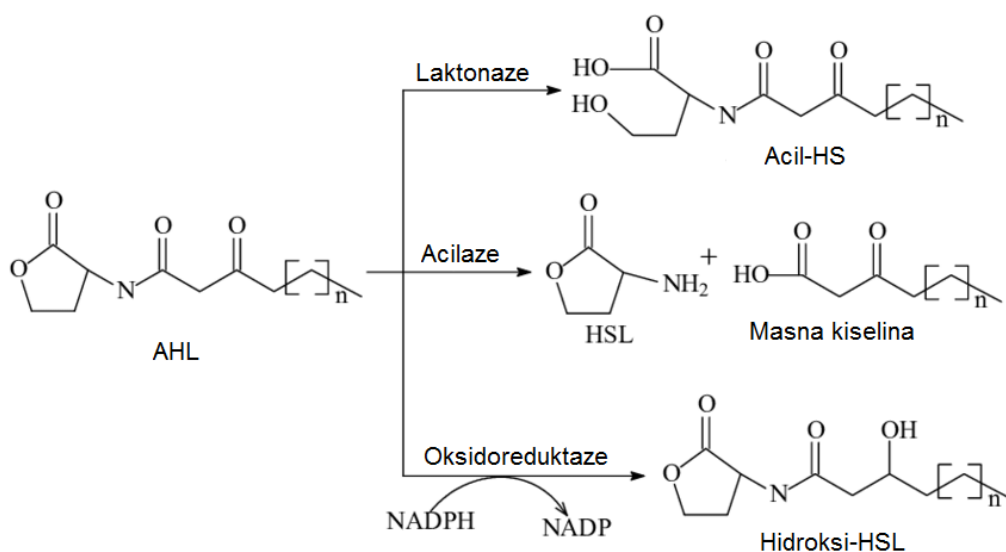
Premda prema poreklu mogu biti veoma raznoliki, najveći broj okarakterisanih QQE izolovan je iz bakterija (Fetzner, 2015). Ovi enzimi potiču kako od QS-emitujućih tako i od QS-neemitujućih mikroorganizama, mada njihova fiziološka uloga vrlo često nije najjasnija. Filogenetskom analizom ustanovljeno je da bakterije producenti QQ enzima pripadaju trima kladama, među kojima su najzastupljeniji rodovi pripadnici  $\beta$  i  $\gamma$  proteobakterija i Gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus* i *Rhodococcus*) (Chen et al., 2013). QQE su na osnovu mehanizma degradacije AHL signala podeljeni u tri grupe (Slika 4):

- laktonaze - katalizuju otvaranje laktonskog prstena (Uroz et al., 2009);
- acilaze (amidaze) - hidrolizuju amidne veze i vrše razdvajanje acilnog lanca (masne kiseline) od laktonskog prstena (Lin et al., 2003);
- oksidoreduktaze - vrše oksidaciju/redukciju acilnog lanca (Chowdhary et al., 2007; Bijtenhoorn et al., 2011).

Enzimska degradacija QS signala može efikasno prekinuti komunikaciju među bakterijama unutar populacije. Smatra se da pojedini mikroorganizmi ne koriste QQE isključivo kao deo odbrambene strategije protiv svojih kompetitora, već upotrebljavaju AHL i produkte njihove degradacije kao izvor ugljenika i azota za rast. Soj *P. aeruginosa* PAO1 i njemu blisko srodne pseudomonade degraduju AHL dugog acilnog lanca (duže od 8 C atoma) koje potom koriste kao izvor energije (Huang et al., 2003).

S obzirom da pripadnici Gram-pozitivnih bakterija ne poseduju AHL-zavisan QS sistem, ekološka uloga QQ enzima poreklom iz *Bacillus* vrsta za sada još nije u potpunosti razjašnjena. Jedna od pretpostavki je da ovi enzimi pre imaju ulogu u detoksifikaciji AHL nego u njihovoj degradaciji, budući da je ova grupa mikroorganizama osetljiva na AHL. Stoga se smatra da bi AHL za *Bacillus* mogli imati svojstvo antibiotika, dok bi laktonaze predstavljale determinante rezistencije na antibiotike (Grandclément et al., 2016).

Iako su QQE prirodnog porekla pokazali značajna svojstva i mogućnost primene u biotehnologiji, upotreba proteinskog inženjerstva usmerena je ka poboljšanju stabilnosti, katalitičke aktivnosti i/ili supstratne specifičnosti ovih enzima u cilju njihove buduće široke primene. Primenom dirigovane evolucije i racionalnog dizajna do danas je inženjerisan veći broj QQ enzima, naročito iz grupe laktonaza poput hipertermostabilne *SsoPox* paraoksonaze poreklom iz *Sulfolobus solfataricus* i termoacidofilne laktonaze poreklom iz *Geobacillus kaustophilus* (Murugayah & Gerth, 2019). Osim toga, uspešno je inženjerisana i PON2 laktonaza humanog porekla koja je pokazala značajan anti-QS potencijal na *P. aeruginosa* (Li et al., 2016).



**Slika 4.** Mehanizam delovanja *quorum quenching* enzima. Slika preuzeta i modifikovana iz Chen et al., 2013.

**Laktonaze** su metaloproteini (izuzev AiiM laktonaze) koji hidrolizuju estarsku vezu laktonskog prstena. Mehanizam delovanja AHL laktonaza je reverzibilan, a budući da je identičan procesu pH-posredovane laktonolize, acidifikacija dovodi do ponovne ciklizacije laktona. Na osnovu nalaza Wang-a i saradnika, prvobitno se smatralo da je hidroliza estarske veze AHL molekula nezavisna od prisustva metalnih jona, da bi se kasnije konačno potvrdilo da su laktonaze dinuklearni metaloproteini sa dva vezana jona cinka u aktivnom mestu (Chan et al., 2016). Pokazano je da laktonaze mogu imati široku supstratnu specifičnost, s obzirom da među ovih enzima predstavlja laktonski prsten koji je očuvan među AHL molekulima, dok promenljivi acilni lanac ostvaruje samo nespecifične interakcije sa aktivnim mestom enzima (LaSarre & Federle, 2013). Do danas je identifikovano preko 30 tipova AHL laktonaza. Aminokiselinska sekvenca i struktura laktonaza veoma je raznolika, stoga su ovi enzimi kategorisani u četiri superfamilije proteina: metalo- $\beta$ -laktamaze, fosfotriesteraze, paraoksonaze i  $\alpha/\beta$ -hidrolaze (Fetzner, 2015). Uprkos vrlo maloj identičnosti aminokiselinske sekvence među različitim podgrupama, sve AHL laktonaze članovi superfamilije metalo- $\beta$ -laktamaza poseduju visoko konzervisan HXXHDH cink-vezujući motiv neophodan za degradaciju signalnih molekula (Thomas et al., 2005).

AHL laktonaze kao što su AidB (poreklom iz *Bosea* sp.), AidC (*Chryseobacterium* sp.), AttM (*Agrobacterium tumefaciens*), RmmL (*Ruegeria mobilis*) i MomL (*Muricauda olearia*) pokazuju veoma široku supstratnu specifičnost u pogledu dužine acilnog lanca AHL molekula (Liu et al., 2007; Wang et al., 2012; Tang et al., 2015; Cai, et al., 2018; Zhang et al., 2019), ali se razlikuju po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama. Brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama utvrđena je sposobnost ovih enzima da degraduju AHL signalne molekule sprečavajući formiranje biofilma (Fan et al., 2017; Dong et al., 2018) i produkciju faktora virulencije *P. aeruginosa* (Tang et al., 2015; Torres et al., 2017). Zbog navedenih svojstava, AHL laktonaze su prepoznate kao obećavajući kandidati za antivirulentnu terapiju.

**Acilaze.** Za razliku od laktonaza, acilaze vrše ireverzibilnu hidrolizu amidne veze između acilnog lanca i laktonskog prstena AHL, što rezultuje nastajanjem masne kiseline i homoserin laktona. Ireverzibilna hidroliza smatra se korisnim svojstvom sa biotehnološkog aspekta, jer ne postoji mogućnost regeneracije funkcionalnog AHL. Supstratna specifičnost acilaza zasniva se na dužini acilnog lanca AHL kao i prisustvu supstitucije na C3 atomu, usled strukturnih ograničenja aktivnog mesta enzima za interakcije sa ligandom (LaSarre & Federle, 2013). Većina acilaza pokazuje sklonost ka AHL dugog lanca (sa ili bez supstituenata na C3 atomu). Prva identifikovana AHL acilaza poreklom je iz  $\beta$  proteobakterije *Variovorax paradoxus* koja produkte degradacije AHL koristi kao izvore energije i azota za obavljanje metaboličkih procesa (Leadbetter & Greenberg, 2000). Do danas su pronađene acilaze poreklom iz *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Comamonas* i *Ochrobactrum* vrsta (Fetzner, 2015). Kao i u slučaju laktonaza, ova grupa enzima ostvaruje značajan anti-QS potencijal posredstvom smanjenja produkcije faktora virulencije (Jiang et al., 2019).

**Oksidoreduktaze.** Enzimi pripadnici klase oksidoreduktaza ne vrše degradaciju AHL molekula, već ih modifikuju u neaktivan oblik oksidacijom ili redukcijom acilnog lanca. Sinteza oksidoreduktaza smatra se protektivnim mehanizmom kod pojedinih bakterijskih vrsta (Jiang et al., 2019). Ustanovljeno je da BpiB09 oksidoreduktaza iz metagenomske biblioteke inaktivira 3-okso-C12-HSL, smanjujući produkciju piocijanina, pokretljivost i formiranje biofilma kod *P. aeruginosa* PAO1 (Chen et al., 2013). Takođe, imobilizacija oksidoreduktaza na staklenoj površini može sprečiti formiranje biofilma vrste *Klebsiella pneumoniae* (Zhang et al., 2018).

### 1.6.3. Primena QQ molekula u medicini i biotehnologiji

Sprečavanje međucelijske komunikacije bakterija postignuto utišavanjem QS sistema (QSI) i degradacijom signalnih molekula (QQE) ključno je za razvoj antivirulentne strategije koja ima za cilj kontrolu patogena kao što je *P. aeruginosa*. U relativno kratkom vremenskom periodu od otkrića QQ fenomena, identifikovano je mnoštvo QQ molekula sa obećavajućim antivirulentnim potencijalom.

QQ strategija pokazala je značajne rezultate u biotehnologiji uključujući borbu protiv biljnih patogena, u akvakulturi, u bioreaktorima korišćenim za prečišćavanje otpadnih voda, uklanjanju naslaga mikroorganizama, kao i u medicinske svrhe (Bzdrenga et al., 2017). Kada je u pitanju primena u medicini, QQ molekuli su našli važno mesto prilikom izrade novih generacija medicinskih uređaja poput katetera, zavoja, aerosola, kontaktnih sočiva i ortopedskih implanata (Rémy et al., 2018).

Međutim, iako se QQ molekuli mogu primenjivati pojedinačno, najbolje efekte ispoljili su kao deo kombinovane terapije u lečenju infekcija izazvanih kliničkim patogenima. Simultana primena antibiotika i antivirulentnog agensa pokazala se kao trenutno najefikasnija strategija u borbi protiv bolesti izazvanih bakterijama (Jiang et al., 2019). Brojne studije povrdile su značaj sinergističkog delovanja antibiotika i anti-QS agenasa u svrhu smanjenja primenjene doze antibiotika i poboljšanja njihove efikasnosti (Vadekeetil et al., 2016; Bahari et al., 2017; Furiga et al., 2015; Kim et al., 2018). Ajoen, furanon-30 i ekstrakt rena smanjuju ekspresiju faktora virulencije *P. aeruginosa* i čine ga znatno osetljivijim na delovanje tobramicina. Takođe je utvrđen sinergistički efekat kurkumina sa gentamicinom i azitromicinom; uz znatno smanjenje doze antibiotika kurkumin je ostvario značajan anti-QS efekat na *P. aeruginosa*.

Pored obećavajućeg biotehnološkog potencijala i uloge u kontroli infekcija, QQ molekuli ostvaruju značajan efekat u prirodi, utičući na mnoge mikrobiološke karakteristike, posebno međusobne interakcije bakterijskih ćelija, interakcije patogen-domaćin i pojedine fiziološke procese.

### 1.7. *Delftia tsuruhatensis*

*Delftia tsuruhatensis* je prvi put izolovana iz mulja u Japanu (Shigematsu et al., 2003) i prvobitno okarakterisana kao vrlo značajan bioremedijator (Sheludchenko et al., 2005; Yan et al., 2011; Juárez-Jiménez et al., 2010) i rizobakterija koja podstiče rast biljaka, jer posredstvom siderofora kompenzuje nedostatak gvožđa u zemljištu (Han et al., 2005; Guo et al., 2016). Takođe, ovaj sredinski mikroorganizam vrši biomineralizaciju metala zlata, cinka i olova (Bautista-Hernández et al., 2012; Guo-Xiang et al., 2018) i odgovoran je za njihovo geohemijsko kruženje u prirodi.

Međutim, novija istraživanja ukazala su na značaj *D. tsuruhatensis* vrste kao patogena odgovornog za povećano izazivanje infekcija kod ljudi, prevashodno u unutarbolničkim uslovima (Preiswerk et al., 2011; Tabak et al., 2013; Ranc et al., 2018). Učestalost pojave *D. tsuruhatensis* naročito je izražena kod imunokompromitovanih osoba, kao i kod pacijenata sa ugrađenim medicinskim uređajima, poput venskih i urinarnih katetera (Frank et al., 2009). Identifikacija ovog oportunističkog patogena iz kliničkih uzoraka može biti veoma problematična, jer se pokazalo da primenom automatizovanih sistema za identifikaciju vrlo često biva okarakterisan kao pripadnik druge vrste iz roda *Delftia*, usled njihovih sličnih metaboličkih svojstava (Ranc et al., 2018). Literaturni podaci ukazuju da ova vrsta zajedno sa oportunističkim patogenom *Achromobacter xylosoxidans* potpomaže formiranje biofilma *Escherichia coli* (Azevedo et al., 2016). Usled koegzistencije u zajedničkoj ekološkoj niši i formiranja mešovityh biofilmova, *D. tsuruhatensis* utiče na povećanje fitnesa *E. coli* i tolerancije na antibiotike.

Dokumentovano je, takođe, da *D. tsuruhatensis* ostvaruje antivirulentni potencijal na *P. aeruginosa* utišavajući njegov QS sistem (Singh et al., 2017). Autori ove studije identifikovali su diizooktil ester 1,2 benzendikarboksilne kiseline kao aktivnu komponentu.



## 1.8. *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia*, vrsta pripadnik *Burkholderia cepacia* kompleksa (Bck) široko je rasprostranjena u prirodi u različitim ekosistemima. Neki sojevi su poznati kao simbionti biljaka, dok su drugi zauzeli važno mesto u biotehnologiji (Compant et al., 2008). Sekundarni metaboliti *B. cepacia* našli su primenu kao agensi u biokontroli fitopatogenih gljiva (Hebber et al., 1998; Li et al., 2007). Pored toga, ova vrsta je prepoznata kao značajan patogen biljaka, životinja i ljudi (Sousa et al., 2011).

Pojava višestruko rezistentnih *B. cepacia* sojeva uzrok je ozbiljnih infekcija kod ljudi praćenih visokom stopom morbiditeta i mortaliteta (Trivedi et al., 2015). Uzrok širenja ovog patogena u bolničkoj sredini povezan je sa unakrsnom transmisijom, čestim medicinskim intervencijama na plućima i kontaktom sa inficiranim pacijentima (Bressler et al., 2007).

Literaturni podaci ukazuju na vrlo kompleksne odnose *B. cepacia* kliničkih izolata sa drugim patogenim vrstama, naročito *P. aeruginosa*. S obzirom da su ova dva patogena najznačajniji uzročnici infekcija kod pacijenata obolelih od cistične fibroze, primećeno je da koagregiraju u plućima izazivajući teške respiratorne bolesti (Eberl & Tümmler, 2004). Interesantno je, takođe, navesti da Bck bakterije imaju sposobnost da prepoznaju i odgovore na QS signalne molekule *P. aeruginosa*, što ukazuje na moguću komunikaciju među različitim bakterijskim vrstama u plućima obolelih od cistične fibroze (Leitão et al., 2010). Ipak, nekoliko istraživanja pokazalo je da su vrednosti fitnesa *P. aeruginosa* veće nego kod *B. cepacia* tokom koinfekcije u mešovitim zajednicama (Schwab et al., 2014; Bernier et al., 2016). Sekundarni metaboliti QS sistema *P. aeruginosa* piocijanin, ramnolipidi i cijanovodonična kiselina ostvaruju negativno dejstvo na bakterijske vrste pripadnike Bck (Smalley et al., 2015). Sa druge strane, populacija *B. cepacia* je znatno tolerantnija od *P. aeruginosa* na nepovoljne uslove životne sredine (Schwab et al., 2014), što ukazuje da je ishod kompeticije ove dve vrste veoma kompleksan i zavisian od mnoštva faktora.

*B. cepacia* koristi AHL-posredovan QS sistem u svrhu kontrole formiranja biofilma i sinteze ekstracelularnih proteina (Aguilar et al., 2003), što vodi ka pojavi virulentnih sojeva (Dales et al., 2009) i za posledicu ima narušavanje imunskog sistema domaćina. CepI/R je globalni regulatorni QS sistem široko rasprostranjen među *Burkholderia* vrstama (Sokol et al., 2007). Takođe je pokazano da *Burkholderia*, pored globalnog QS sistema, koristi i druge QS mehanizme u cilju regulacije pojedinih fizioloških procesa (Sokol et al., 2007). Chan je sa saradnicima (Chan et al., 2011) ustanovio da *B. cepacia* može istovremeno posedovati i QS i QQ sistem, pri čemu je identifikovan QQ enzim oksidoreduktaza sa znatnom efikasnošću u smanjenju virulencije biljnog patogena *Erwinia carotovora*. I pored toga, do sada nisu sprovedena istraživanja usmerena ka ispitivanju QQ potencijala *B. cepacia*, naročito u kontekstu uloge QQ molekula u čišćenju i recikliranju sopstvenih QS signala, kao i u smanjenju virulentnog potencijala drugih kliničkih patogena.

# **Ciljevi istraživanja**

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu činjenicu da infekcije izazvane bakterijama višestruko rezistentnim na klinički značajne antibiotike predstavljaju narastajući izazov za kliničku praksu, pronalazak novih bioaktivnih molekula koji bi poslužili kao potentni antivirulentni agensi je jedan od prioriteta savremenih istraživanja.

Budući da u literaturi nedostaju detaljni podaci o prirodi i potencijalu utišivača međučelijske komunikacije bakterija poreklom iz mikroorganizama koji dele zajedničko stanište sa *P. aeruginosa*, od velikog je značaja izučavanje na koji način različite bakterijske vrste posredstvom utišivačkih molekula vrše kompeticiju za ograničene resurse deleći istu ekološku nišu ili se čak koordinišu sa ovim izuzetno značajnim patogenom. Pored toga, funkcionalna karakterizacija ovih molekula može biti od velikog značaja u smislu njihove potencijalne primene u terapijske svrhe u cilju smanjenja virulentnih svojstava *P. aeruginosa*. Identifikacija i karakterizacija novih molekula utišivača međučelijske komunikacije koje proizvode Gram-negativne bakterije, kao i utvrđivanje njihovog antivirulentnog potencijala predstavlja predmet proučavanja ove doktorske teze.

U skladu sa time, postavljeni su sledeći ciljevi ovog istraživanja:

1. Odabir Gram-negativnih kliničkih izolata iz kolekcije mikroorganizama Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju koji ispoljavaju fenotip utišavanja međučelijske komunikacije bakterija (QQ fenotip);
2. Sekvenciranje i *in silico* analiza celokupnih genoma odabranih sojeva nosioca QQ fenotipa i identifikacija genetičkih determinanti koje kodiraju molekule utišivače međučelijske komunikacije bakterija;
3. Ekstrakcija i biohemijska karakterizacija QQ molekula neproteinske prirode;
4. Kloniranje i ekspresija gena koji kodira(ju) QQ enzim(e) kao i ispitivanje zavisnosti ekspresije gena od faze rasta bakterijske kulture;
5. Funkcionalna karakterizacija QQ molekula i ispitivanje njihovog antivirulentnog potencijala na model sistema kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83: (i) analiza delovanja na formiranje i dekompoziciju biofilma, (ii) ispitivanje efekta QQ molekula na rast *P. aeruginosa* MMA83 i osetljivost na antibiotike, (iii) utvrđivanje značaja QQ molekula u smanjenju produkcije ekstracelularnih faktora virulencije, (iv) uticaj QQ molekula na ekspresiju gena signalnih puteva međučelijske komunikacije izolata *P. aeruginosa* MMA83;
6. Ispitivanje citotoksičnog efekta QQ molekula na HaCaT humanoј ćelijskoј liniji.

# **Materijal i metode**

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Bakterijski sojevi i derivati

Bakterijski sojevi kliničkog porekla korišćeni u ovom istraživanju navedeni su u Prilogu 1. Sojevi nosioci fenotipa utišavanja međuceljske komunikacije bakterija, sojevi korišćeni u genetičkim manipulacijama tokom izrade ove teze kao i dobijeni derivati navedeni su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Spisak bakterijskih sojeva i dobijenih derivata.

Bakterijski izolat/derivat	Relevantne karakteristike	Literatura/izvor
<i>Achromobacter</i> spp.		
13011	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks		
BCC7	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC8	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC9	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC19	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC20	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC24	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC66	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Vasiljevic et., 2016
BCC301	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
BCC302	Soj recipijent korišćen u konjugativnom transferu, Amp <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
BCC532	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
BCC4135	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
BCC302 pMP220	Transkonjugant pMP220	Ovo istraživanje
BCC302 pMP220YtnP	Transkonjugant pMP220YtnP	Ovo istraživanje
BCC302 pMP220Y2-aiiA	Transkonjugant pMP220Y2-aiiA	Ovo istraživanje
<i>Delftia</i> spp.		
11304	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
6960/2	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
<i>Stenotrophomonas</i> spp.		
1556	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
6646	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
6960	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
7451	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje

<i>Ralstonia</i> spp.		
630	QQ <sup>+</sup> , LMM kolekcija	Ovo istraživanje
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
CV026	ATCC 31532 soj, <i>cviI::Tn5xylE</i> , Km <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	McClellan et al., 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
MMA83	Klinički izolat, NDM-1 pozitivan, Amp <sup>r</sup> , LMM kolekcija	Jovicic et al., 2011
PAOJP2/pKD-rhlA	$\Delta rhlA$ <i>PrhlA::lux</i> , soj biosenzor za detekciju C4-HSL	Duan & Surette, 2007
PA14-R3	$\Delta lasI$ <i>Prsal::lux</i> , soj biosenzor za detekciju 3-okso-C12-HSL	Massai et al., 2011
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169$ ( $\Phi 80 lacZ\Delta M15$ ), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA</i>	Hanahan, 1983
M15	<i>lacZ\Delta M15</i> , pREP4 plazmid, Km <sup>r</sup>	Qiagen
pRK2013	RK2 derivat, soj koji poseduje samoprenosivi pRK2013 "helper" plazmid, Km <sup>r</sup>	Figurski & Helinski, 1979
pMP220	Soj DH5 $\alpha$ transformisan pMP220 plazmidom	Spaink et al., 1987
pMP220YtnP	Soj koji nosi pMP220 plazmid sa ugrađenom promotorskom sekvencom gena koji kodira YtnP laktonazu	Ovo istraživanje
pMP220Y2-aiiA	Soj koji nosi pMP220 plazmid sa ugrađenom promotorskom sekvencom gena koji kodira Y2-aiiA laktonazu	Ovo istraživanje

LMM - Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju; QQ<sup>+</sup> - prisustvo *quorum quenching* fenotipa; NDM-1-Nju Delhi metalo- $\beta$ -laktamaza 1; Km<sup>r</sup> - rezistencija na kanamicin; Sm<sup>r</sup> - rezistencija na streptomycin; Amp<sup>r</sup> - rezistencija na ampicilin; Gm<sup>r</sup> - rezistencija na gentamicin; Tet<sup>r</sup> - rezistencija na tetraciklin; ATCC - American type culture collection, Rockville, Merilend, SAD.

### 3.2. Korišćeni i konstruisani plazmidi

Plazmidi korišćeni u izradi ove teze prikazani su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Spisak plazmida korišćenih u ovoj tezi.

Plazmid	Relevantne karakteristike	Literatura/izvor
pJET 1.2	Vektor za kloniranje PCR produkata, Amp <sup>r</sup>	ThermoFisher Scientific
pQE30	ColE1 replikon, His <sub>6</sub> vektor za ekspresiju, Amp <sup>r</sup>	Qiagen
pMP220	Vektor za kloniranje promotorskih sekvenci, Tet <sup>r</sup>	Spaink et al., 1987
pJETYtnP	PCR produkt <i>ymP</i> gena kloniran u pJET 1.2 vektor	Ovo istraživanje
pJETY2-aiiA	PCR produkt <i>y2-aiiA</i> gena kloniran u pJET 1.2 vektor	Ovo istraživanje
pQE30YtnP	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment iz pJETYtnP kloniran u pQE30 vektor ( <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III)	Ovo istraživanje

pQE30Y2-aiiA	<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III fragment iz pJETy2-aiiA kloniran u pQE30 vektor ( <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III)	Ovo istraživanje
pJETpYtnP	PCR produkt promotorske sekvence <i>ynP</i> gena kloniran u pJET 1.2 vektor	Ovo istraživanje
pJETpY2-aiiA	PCR produkt promotorske sekvence <i>y2-aiiA</i> gena kloniran u pJET 1.2 vektor	Ovo istraživanje
pMP220YtnP	<i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment iz pJETpYtnP kloniran u pMP220 vektor ( <i>Bgl</i> II- <i>Pst</i> I)	Ovo istraživanje
pMP220y2-aiiA	<i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I fragment iz pJETpY2-aiiA kloniran u pMP220 vektor ( <i>Bgl</i> II- <i>Pst</i> I)	Ovo istraživanje

### 3.3. Medijumi za kultivaciju bakterija

Bakterijski izolati korišćeni u ovom istraživanju kultivisani su u Luria-Bertani (LB) tečnom medijumu (1% tripton, 0,5% ekstrakt kvasca i 0,5% natrijum hlorid). Polučvrsta podloga za rast pripremljena je dodavanjem 0,5% agara, dok je čvrsta podloga dobijena dodavanjem 1,7% agara u LB tečni medijum. Za potrebe izolacije RNK, testa mikrodilucije i formiranja biofilma, bakterije su gajene u komercijalnom Mueller-Hinton (MH) tečnom medijumu (Oxoid, Hempšir, Velika Britanija). Pored toga, za potrebe ekstrakcije *quorum sensing* inhibitora (QSI), kultivacija bakterija vršena je u minimalnom M9 medijumu (10 × M9 tečni medijum sadrži 33,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,55 mM NaCl, 9,35 mM NH<sub>4</sub>Cl; 0,4% glukoze; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,3 mM CaCl<sub>2</sub>) uz dodavanje 0,24% piruvata. Medijumi su sterilisani u autoklavu u trajanju od 20 min na 121°C.

Sojevi *E. coli* transformisani različitim vektorima kultivisani su u LB medijumu sa odgovarajućim antibioticima (ampicilin 100 µg/ml, kanamicin 100 µg/ml). Za potrebe određivanja osetljivosti *P. aeruginosa* MMA83 na antibiotike i kombinovani efekat antibiotika i QSI ekstrakta mikrodilucionom metodom u MH tečni medijum dodavani su gentamicin (0,002-4,096 mg/ml) i meropenem (0,002-2,048 mg/ml). U eksperimentu selekcije konjuganata koji poseduju konstrukte sa promotorskim fuzijama korišćeni su antibiotici gentamicin (40 µg/ml) i tetraciklin (40 µg/ml).

Svi bakterijski sojevi gajeni su na 37°C, izuzev *Chromobacterium violaceum* CV026 koji je kultivisan na 30°C, uz intenzivnu aeraciju na 180 rpm.

Sojevi, derivati, kao i dobijeni transformanti skladišteni su u LB medijumu sa 15% glicerolom na -80°C.

#### 3.4.1. Selekcija izolata sa *quorum quenching* (QQ) aktivnošću

Inicijalna pretraga laboratorijske kolekcije Gram-negativnih kliničkih izolata Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu (LMM, IMGGIUB) za prisustvom *quorum quenching* (QQ) fenotipa realizovana je primenom testa difuzije u bunarićima. Kao biosenzor soj korišćen je *C. violaceum* CV026, mutant za sintezu ljubičastog pigmenta violaceina (McClellan et al., 1997). Prekonoćna kultura *C. violaceum*

CV026 (0,5% finalna zapremina) inokulisana je u prethodno otopljenoj LB polučvrstoj podlozi uz dodavanje 5  $\mu$ M N-heksanoil-DL-homoserin laktone (C6-HSL) (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), inducira sintezu violaceina. Bunarići su formirani u LB polučvrstoj podlozi, a potom napunjeni sa 50  $\mu$ l prekonocne kulture testiranih kliničkih izolata. Inkubacija se odvijala 24 h na 30°C, temperaturi optimalnoj za rast indikator soja. QQ fenotip detektovan je na osnovu odsustva ljubičaste boje oko bunarića, kao dokaz inhibicije sinteze pigmenta violaceina. U ovu pretragu uključena su 633 klinička izolata iz LMM kolekcije.

QQ aktivnost odabranih sojeva praćena je kroz različite faze rasta. Prekonocne kulture gustine 0,05 McFarland-a inokulisane su u svežem LB medijumu i kultivisane narednih 24 h, odnosno 30 h, uz aeraciju na 37°C. Alikvoti bakterijskih kultura sakupljani su u različitim vremenskim intervalima (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24 i 30 h za *Delftia tsuruhatensis* 11304 i 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 i 24 h za *Burkholderia cepacia* BCC4135) i pripremljena je serija desetostrukih razblaženja kako bi se odredio broj formiranih kolonija (eng. *colony-forming units*, CFU) u mililitru (CFU/ml). Istovremeno je praćena QQ aktivnost primenom testa difuzije u bunarićima, pri čemu je meren dijametar zone inhibicije produkcije violaceina. Eksperiment je rađen u triplikatu.

### 3.4.2. Selekcija izolata sa *quorum sensing* (QS) fenotipom

*Quorum sensing* (QS) fenotip *B. cepacia* BCC4135 soja ispitan je metodom opisanom u odeljku 3.4.1. sa uvedenom modifikacijom. U LB polučvrsti agar nije dodavan inducer sinteze violaceina, C6-HSL. Formiranje ljubičastog oreola oko bunarića uzeto je kao pokazatelj prisustva QS fenotipa.

Takođe, QS aktivnost ovog soja praćena je kroz različite faze rasta kao u prethodno opisanom odeljku. Meren je dijametar formirane ljubičaste zone oko bunarića. Eksperiment je rađen u triplikatu.

### 3.5. Ispitivanje prirode QQ molekula

Priroda molekula odgovornih za ispoljavanje QQ fenotipa ispitivana je testom degradacije upotrebom proteinaze K, serinske proteaze širokog spektra. Prekonocne kulture odabranih sojeva kao i njihovi supernatanti inkubirani su sa proteinazom K (500  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) na 37°C u trajanju od 3 h. Supernatanti su prethodno dobijeni centrifugiranjem prekonocne kulture ( $15871 \times g$ , 15 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) i filtriranjem upotrebom sterilnog filtera dijametara 0,22  $\mu$ m (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Preostala QQ aktivnost, nakon tretmana proteinazom K, merena je primenom testa difuzije u bunarićima opisanom u odeljku 3.4.1.



### 3.6. Priprema neprečišćenog ekstrakta QQ molekula

Bakterijska kultura *D. tsuruhatensis* 11304 (zapremina 5 l) gajena je u M9 minimalnom medijumu uz dodatak 0,24% piruvata (24 h, 37°C). Nakon centrifugiranja (13680 × g, 30 min, 4°C; centrifuga Sorvall RC-5B, GS4 rotor, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i filtriranja (filter 0,22 μm, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka), dobijeni supernatant podeljen je u četiri staklena erlenmajera i u svaki pojedinačno je dodata jednaka zapremina metanola, hloroforma, etil-acetata i heksana (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) i usledila je inkubacija od 30 min na sobnoj temperaturi uz intenzivno mešanje. Faze organskih rastvarača i supernatanta su potom razdvojene, nakon čega je usledilo uparavanje svake od organskih faza pod vakuumom (Buchi Rotavapor, R200, Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD) na temperaturi od 50°C za etil-acetat i 30°C za metanol, heksan i hloroform. Masa osušenih ekstrakata utvrđena je korišćenjem analitičke vage (Sartorius, Göttingen, Nemačka). Za potrebu bioloških testova, ekstrakti su rastvoreni u dimetil-sulfoksidu (DMSO) i skladišteni na -20°C do korišćenja. QQ aktivnost dobijenih ekstrakata ispitana je primenom testa difuzije u bunarićima (odeljak 3.4.1.).

### 3.7. Metode rada sa DNK molekulima bakterija

#### 3.7.1. Izolacija ukupne DNK iz bakterija

Ukupna DNK iz odabranih sojeva izolovana je po metodi koju su opisali Hopwood i saradnici (1985) uz izvesne modifikacije. Talog dobijen centrifugiranjem 1,5 ml prekonoćne kulture (15871 × g, 2 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) opran je u TEN puferu (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0), a potom je usledio korak ćelijske lize dodavanjem 250 μl 2% SDS-a (eng. *sodium dodecyl sulfate*) i 1 μl proteinaze K (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), uz intenzivno mešanje. Smeša je potom inkubirana na 50°C, u trajanju od 30 min. Po završetku inkubacije, vršeno je uklanjanje proteina iz uzoraka višestrukim uzastopnim dodavanjem 200 μl neutralnog fenol-hloroforma uz vorteksovanje (30 s), a potom centrifugiranje (15871 × g, 10 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) sve do gubitka belog interfaznog sloja. Dobijeni supernatant prebačen je u nove mikrotube, nakon čega je usledila precipitacija DNK dodavanjem 1/10 volumena nepuferisanog 3 M Na-acetata i 7/10 volumena n-propanola (15871 × g, 20 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Talog ukupne DNK oslobođen je viška soli dodavanjem 500 μl hladnog 70% etanola i centrifugiranjem (15871 × g, 10 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) a zatim je osušen (42°C, 20-30 min) i resuspendovan u bidestilovanoj vodi. Preostala RNK eliminisana je dodavanjem 1 μl RNaze (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) u uzorak i inkubacijom na 37°C u trajanju od 30 min. Izolovana ukupna DNK čuvana je na -20°C.

#### 3.7.2. Izolacija plazmidne DNK iz *E. coli*

Plazmidna DNK iz *E. coli* izolovana je prema modifikovanoj mini-metodi "JETSTAR Plasmid Kit-MINI" (Genomed, GmbH, Austrija). Nakon obaranja ćelija prekonoćne kulture (15871 × g, 1 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), talog je opran u TEN puferu, a potom resuspendovan dodavanjem 200 μl E1 rastvora (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) koji sadrži RNazu (finalna

koncentracija 100 µg/ml, Sigma-Aldrich, Misuri, SAD). Suspenzija je homogenizovana intenzivnim mešanjem, a potom je izvršena ćelijska liza dodavanjem 200 µl rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje. Neutralizacija je vršena dodavanjem 200 µl rastvora E3 (3 M K-acetat, pH 5,5), uz intenzivno mešanje i potomje centrifugiranje (15871 × g, 10 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Supernatant je prebačen u nove mikrotube, dodato je 50 µl neutralnog fenol-hloroforma, i usledilo je intenzivno mešanje i centrifugiranje (15871 × g, 5 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Supernatant je potom prebačen u nove mikrotube, a DNK iz rastvora precipitirana je dodavanjem 7/10 volumena n-propanola (15871 × g, 20 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Plazmidna DNK oslobođena je viška soli dodavanjem 500 µl hladnog 70% etanola i centrifugiranjem (15871 × g, 10 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Talog je osušen (42°C, 20-30 min) i resuspendovan u bidestilovanoj vodi uz dodavanje 1 µl RNaze (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) u uzorak i inkubaciju (37°C, 30 min). Uzorci plazmidne DNK skladišteni su na -20°C do korišćenja.

### 3.7.3. Izolacija plazmidne DNK iz *E. coli* za potrebe sekvenciranja i kloniranja

Za potrebe sekvenciranja i kloniranja, plazmidna DNK iz *E. coli* izolovana je upotrebom komercijalnog kita "Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit" (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD), prema uputstvima proizvođača.

### 3.7.4. Sečenje DNK restrikcionim enzimima

Komercijalno dostupne restrikcione endonukleaze (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD) korišćene su za sečenje bakterijske DNK. Uslovi enzimske reakcije (temperatura i vreme inkubacije), količina enzima kao i odgovarajući puferi neophodni za enzimsku aktivnost, primenjivani su u skladu sa preporukama proizvođača.

### 3.7.5. Ligacija DNK fragmenata

Ligacija DNK fragmenata vršena je u reakcionoj smeši inkubacijom odgovarajućih vektora sa DNK fragmentima koji poseduju komplementarne lepljive krajeve. Reakcija se odvijala u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5) uz dodavanje 1 U/µl T4 DNK ligaze (New England Biolabs, Ipswich, Masačusets, SAD) u odgovarajućem odnosu (finalna zapremina 20 µl) i vremenu inkubacije od 16 h na 16°C.

### 3.7.6. Umnožavanje DNK fragmenata

PCR metoda (eng. *Polymerase Chain Reaction*) primenjena je za umnožavanje DNK fragmenata. Geni od interesa, sekvence prajmera kao i očekivane veličine fragmenata prikazani su u Tabeli 3. Za umnožavanje gena PCR metodom pripremljena je reakciona smeša koja sadrži sledeće

komponente: ukupnu DNK izolata *B. cepacia* BCC4135 kao matricu (0,1-1 µg), 1 × Phusion™ HF reakcioni pufer (sadrži 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), smešu dNTP (svaki dNTP u koncentraciji od 0,2 mM), prajmere (2,5 mM), 1 µl DMSO, Phusion™ High-Fidelity DNK polimerazu (finalna koncentracija 0,02 U/µl; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i bidestilovanu vodu (finalna zapremina do 25 µl). Reakciona smeša koja je sadržala sve komponente izuzev DNK matrice korišćena je kao negativna kontrola. PCR produkti dobijeni su korišćenjem uređaja Eppendorf 5345/5340 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

**Tabela 3.** Spisak prajmera korišćenih u ovoj tezi.

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina fragmenta (bp)	Literatura
<i>ytnP</i>	Forward	ATGGATCCACGCTTACCTTTCCC	843	Ovo istraživanje
	Reverse	GGCCGTAAGCTTCACTCCTCGCGTCATAGCGC		
<i>y2-aiiA</i> <sup>1</sup>	Forward	CGGGATCCGAACCGGGCGGTGCGG	894	Ovo istraživanje
	Reverse	CCCGAAGCTTACCGCAGCGGCGTCGCGTCG		
<i>ytnP</i> promotor	Forward	GGATCCCCTGACGAAAATCTTG	324	Ovo istraživanje
	Reverse	CTGCAGCATCGTGCTTCTCCGGATCGGCG		
<i>y2-aiiA</i> promotor	Forward	GGATCCGGCCGCGTAAGTCGCG	156	Ovo istraživanje
	Reverse	CTGCAGCATGTCCGCTCCCCGGTTGCGTATC		

<sup>1</sup>Gen umnožen sa dizajniranim forward prajmerom bez signalne sekvence.

Restrikciona mesta *Bam*HI i *Hind*III enzima za *ytnP* i *y2-aiiA* gene, kao i sekvence koje prepoznaju *Bam*HI i *Pst*I enzimi gena promotora su podvučeni.

Za umnožavanje *ytnP* i *y2-aiiA* sekvenci primenjen je sledeći program: inicijalna denaturacija dvolančane DNK 10 min na 98°C; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije 30 s na 98°C; hibridizacije (eng. *annealing*) 30 s na 58°C (za *ytnP*) i 69°C (za *y2-aiiA*) i elongacije 1 min na 72°C; poslednji ciklus elongacije 7 min na 72°C.

PCR produkti promotorskih sekvenci dobijeni su u sledećim uslovima reakcije: inicijalna denaturacija dvolančane DNK 3 min na 98°C; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije 30 s na 98°C; hibridizacije (eng. *annealing*) 30 s na 57°C (za *ytnP* promotor) i 64°C (za *y2-aiiA* promotor) i elongacije 30 s na 72°C; poslednji ciklus elongacije 7 min na 72°C.

Dobijeni PCR produkti prečišćeni su upotrebom komercijalnog kita "Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit" (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), prema uputstvima proizvođača.

### 3.7.7. Sekvenciranje DNK fragmenata

Prečišćeni PCR produkti kao i plazmidna DNK izolovana iz *E. coli* upotrebom komercijalnog kita uslužno su sekvencirani u MacroGen servisu za sekvenciranje (MacroGen Europe Service, Amsterdam, Holandija).

### 3.7.8. Sekvenciranje celokupnog genoma

Celokupna genomska DNK odabranih kliničkih izolata uslužno je sekvencirana u centru za sekvenciranje MicrobesNG (IMI-School of Biosciences, Univerzitet u Birmingemu, Birmingem, Velika Britanija) korišćenjem Illumina HiSeq 2500 platforme.

### 3.7.9. Horizontalna gel elektroforeza DNK

Horizontalna gel elektroforeza primenjena je za analizu ukupne DNK, plazmidne DNK kao i PCR-om umnoženih fragmenata. Agarozni gel (1%) pripremljen je rastvaranjem agaroze (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) u  $1 \times$  TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) uz dodavanje etidijum bromida (0,5  $\mu$ g/ml). Elektroforeza je vršena u  $1 \times$  TAE puferu, pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm<sup>2</sup> gela, na sobnoj temperaturi. Veličina analiziranih DNK sekvenci ustanovljena je na osnovu poređenja sa kretanjem DNK standarda na istom agaroznom gelu. Kao standard upotrebljen je GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD).

## 3.8. Genetičke manipulacije

### 3.8.1. Kloniranje gena koji kodiraju QQ enzime

PCR produkti *ytnP* i *y2-aiiA* gena (odjeljak 3.7.6.) poreklom iz *B. cepacia* BCC4135 klonirani su u pJET 1.2 vektor (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD), a zatim su *E. coli* DH5 $\alpha$  ćelije transformisane dobijenim ligacionim smešama. Restrikcionim enzimima (*Bam*HI i *Hind*III) analizirano je prisustvo pJETytnP i pJETy2-aiiA konstruisanih plazmida u DH5 $\alpha$  transformantima, a potom i sekvenciranjem (odjeljak 3.7.7.). *Bam*HI-*Hind*III fragmenti iz pJETytnP i pJETy2-aiiA klonirani su u pQE30 vektor za ekspresiju tagovan sa His<sub>6</sub> (Qiagen, Hilden, Nemačka) prethodno linearizovan *Bam*HI/*Hind*III enzimima. Dobijeni su pQE30YtnP i pQE30Y2-aiiA konstrukti kojima su potom transformisane *E. coli* M15, kompetentne ćelije korišćene za ekspresiju rekombinantnih proteina. Sekvenciranjem je proverena tačnost dobijenih konstrukata kao i inkorporacija u fazi čitanja u pQE30 vektoru.

### 3.8.2. Konstrukcija promotorskih fuzija

Promotorske sekvence *ytnP* i *y2-aiiA* gena konstruisane su na sledeći način: 324 bp (+3 do -321 u odnosu na ATG sekvencu *ytnP* gena) i 156 bp (+3 do -153 u odnosu na ATG sekvencu *y2-aiiA* gena) DNK fragmenti umnoženi su PCR metodom (odjeljak 3.7.6.) i klonirani u pJET 1.2 vektor. Dobijeni su pJETpYtnP i pJETpY2-aiiA konstrukti. Vektor za kloniranje promotorskih sekvenci pMP220 linearizovan je *Bg*III/*Pst*I enzimima i potom je korišćen za subkloniranje promotorskih sekvenci (kao *Bam*HI-*Pst*I fragmenata) uzvodno od *lacZ* gena dajući pMP220YtnP i pMP220Y2-aiiA konstrukte. Izvršena je transformacija *E. coli* DH5 $\alpha$  ćelija. Sekvenciranjem je proverena tačnost dobijenih konstrukata.

### 3.9. Transformacija *E. coli* ćelija

#### 3.9.1. Priprema *E. coli* kompetentnih ćelija

Kompetentne *E. coli* (DH5 $\alpha$  i M15) ćelije korišćene u transformaciji temperaturnim šokom (eng. *heat shock*), pripremljene su prema modifikovanoj metodi sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985). *E. coli* kultura inokulisana je resuspendovanjem 10 kolonija u 100 ml svežeg LB medijuma i gajena na 37°C, uz intenzivnu aeraciju (180 rpm). Rast bakterijske kulture zaustavljen je (inkubacijom 15 min na ledu) nakon dostizanja srednje logaritamske faze rasta (optička gustina na OD<sub>600</sub> vrednosti 0,3-0,6). Nakon hlađenja, ćelije su istaložene (2205  $\times$  g, 10 min, 4°C; Eppendorf 5804R, Hamburg, Nemačka), supernatant je odliven, a talog potom resuspendovan u prethodno ohlađenom 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Nakon inkubacije (15 min na ledu), ćelije su ponovo oborene (2205  $\times$  g, 10 min, 4°C; Eppendorf 5804R, Hamburg, Nemačka), a talog resuspendovan u 1/12,5 zapremine RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>  $\times$  2H<sub>2</sub>O, 15% glicerol, pH 6,8). Ćelijske suspenzije su inkubirane narednih 15 min na ledu, a potom podeljene u alikvote od po 200  $\mu$ l (u prethodno ohlađene mikrotube), i istovremeno zamrzavane u tečnom azotu. Dobijene kompetentne ćelije skladištene su na -80°C do korišćenja.

#### 3.9.2. Transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija toplotnim šokom

Prethodno pripremljene kompetentne *E. coli* (DH5 $\alpha$  i M15) ćelije transformisane su izlaganjem termičkom stresu (eng. *heat shock*). Prilikom korišćenja ćelije su otopljene na ledu, a potom je otopljenoj suspenziji dodata ligaciona smeša (20  $\mu$ l), nakon čega je usledila inkubacija na ledu narednih 40-60 min, uz povremeno lagano mešanje. Po završenoj inkubaciji, ćelje su izlagane temperaturnom stresu u trajanju od 90 s na 42°C, a zatim su ponovo inkubirane 5 min na ledu. Usledila je regeneracija ćelija dodavanjem 300  $\mu$ l svežeg LB medijuma i inkubacijom u vremenskom intervalu od 30-60 min na 37°C, uz intenzivnu aeraciju. Alikvoti ćelija su potom razmazani na selektivne čvrste LB podloge (sa odgovarajućim antibiotikom) i inkubirani na 37°C do pojave transformanata.

### 3.10. Triparentalna konjugacija

Triparentalna konjugacija vršena je mešanjem donora koji nosi promotorsku fuziju (*E. coli* pMP220YtnP ili *E. coli* pMP220Y2-aiiA), recipijenta (*B. cepacia* BCC302) i pomoćnog soja (*E. coli* pRK2013). Nakon dostizanja logaritamske faze rasta, ćelijske kulture (10 ml) oprane su tri puta u svežem LB medijumu kako bi se uklonili antibiotici, a potom pomešane u odgovarajućem odnosu. Dobijena smeša naneta je na sterilnu nitroceluloznu membranu (0,45  $\mu$ m) postavljenu na čvrstoj LB podlozi. Nakon inkubacije (37°C, 16 h), transkonjuganti su selektovani na LB podlozi koja sadrži gentamicin (40  $\mu$ g/ml) i tetraciklin (40  $\mu$ g/ml).

### 3.11. $\beta$ -galaktozidazni esej

Aktivnost enzima  $\beta$ -galaktozidaze praćena je prema protokolu koji je opisao Miller (1972) uz izvesne modifikacije (Stachel et al., 1985). Enzim  $\beta$ -galaktozidaza korišćen je kao molekul reporter za merenje aktivnosti promotorskih fuzija analiziranih u ovoj tezi. Prekonoćne kulture dobijenih transkonjuganata razblažene su do gustine od 0,05 McFarland-a i inokulisane u LB medijumu sa odgovarajućim antibioticima. Usledila je kultivacija na 37°C narednih 24 h, uz intenzivnu aeraciju. Alikvoti bakterijskih kultura sakupljani su u različitim vremenskim tačkama koje odgovaraju ranoj (2 h), srednjoj (6 h), kasnoj logaritamskoj (8 h), stacionarnoj (12 h) i kasnoj stacionarnoj fazi (24 h) i iskorišćeni za  $\beta$ -galaktozidazni esej. Bakterijske kulture (100  $\mu$ l) pomešane su sa 500  $\mu$ l Z pufera (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  $\times$  7H<sub>2</sub>O, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  $\times$  H<sub>2</sub>O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>  $\times$  7H<sub>2</sub>O, 50 mM  $\beta$ -merkaptotanol, pH 7,0), 20  $\mu$ l hloroforma i 20  $\mu$ l 0,05% SDS-a. Smeša je intenzivno promešana upotrebom vorteksa (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), a zatim je započeta enzimska reakcija dodavanjem 100  $\mu$ l ONPG (eng. *ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside*, 4 mg/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD). Reakcija je zaustavljena dodavanjem 250  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, i beleženo je vreme reakcije.  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost izražena je prema sledećoj formuli:

$$MU = 1000 \times \frac{A_{420}}{t \times V \times A_{600}} \times 10$$

A<sub>420</sub> - optička gustina uzorka enzimske reakcije

A<sub>600</sub> - optička gustina bakterijske kulture

t - vreme enzimske reakcije (min)

V - zapremina enzimske reakcije (ml)

1000, 10 - korekcionni koeficijenti

Enzimska aktivnost izražena je u Milerovim jedinicama (eng. *Miller units*, MU). Kao negativna kontrola korišćen je soj *B. cepacia* BCC302 transformisan praznim pMP220 vektorom. Eksperiment je rađen u triplicatu.

### 3.12. Metode rada sa proteinima

#### 3.12.1. Prečišćavanje rekombinantnih proteina YtnP i Y2-aiiA u denaturišućim uslovima

Prečišćavanje rekombinantnih proteina YtnP i Y2-aiiA izvršeno je u skladu sa preporukama proizvođača (The QIAexpressionist Kit, Qiagen, Hilden, Nemačka), uz izvesne modifikacije (Grönlund et al., 2003). Rekombinantni enzimi obeleženi sa His<sub>6</sub> izolovani su iz 100 ml bakterijske kulture *E. coli* M15 ćelija koje su nosile konstruisane vektore pQE30YtnP ili pQE30Y2-aiiA. Pri dostizanju logaritamske faze rasta (23°C, 180 rpm), odvojen je i saćuvan 1 ml neindukovanih ćelija, nakon čega je u kulturu dodat IPTG (izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid; finalna koncentracija 0,1 mM; Serva, Heidelberg, Nemačka) u cilju indukcije ekspresije rekombinantnih proteina u trajanju od 3 h (23°C, 180 rpm). Po završetku indukcije, odvojen je i saćuvan 1 ml indukovanih ćelija, a ostatak ćelija je istaložen (4500  $\times$  g, 15 min; Eppendorf 5804R, Hamburg, Nemačka). Talog je zatim resuspendovan u puferu za lizu (8 M urea, 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 10  $\mu$ M DTT, 20 mM imidazol,

pH 8,0) u odnosu 1 ml pufera: 1 g ćelija, i inkubiran na ledu 30 min. Lizirane ćelije su potom izložene ultrazvuku (10 pulseva, 10 s, 50 kHz, na ledu, sa pauzama od 10 s; MSE Soniprep 150, London, Velika Britanija). Nakon toga je usledilo centrifugiranje suspenzije ( $4500 \times g$ , 45 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ; Eppendorf 5804R, Hamburg, Nemačka). Dobijeni supernatant je potom inkubiran sa Ni-NTA agarozom (1 ml Ni-NTA agroze/4 ml lizata) u trajanju od 1 h na  $4^{\circ}\text{C}$ , uz konstantno mešanje. Dobijeni uzorak nanet je na afinitetnu kolonu (prethodno ekvilibrisanu puferom korišćenim za lizu) i ispiran u etapama nalivanjem 2 ml pufera u gradijentu uree 8 M – 0 M (8 M, 5 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M i 0 M). Rekombinantni enzimi eluirani su sa afinitetne kolone puferom za eluciju koji sadrži: 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 10  $\mu\text{M}$  DTT, 0,5 M imidazol, pH 8,0. Sve sakupljene frakcije su sačuvane a potom analizirane 12,5% SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Iz uzoraka rekombinantnih proteina uklonjen je imidazol gel filtracijom na koloni sa graničnim porama za molekule od 10 kDa (Amicon Ultra, Merck Milipore Ltd., Kork, Irska). Uzorci su prevedeni u 20 mM Tris-HCl pufer pH 7,4 sa 50% glicerola i skladišteni na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.12.2. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorku utvrđena je spektrofotometrijski primenom Bradfordove metode (Bradford, 1976). Za konstruisanje standardne krive korišćene su poznate koncentracije albumina govedeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) u opsegu 1-20 mg/ml. Bradfordov reagens (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD), inkubiran je sa YtnP i Y2-aiiA rekombinantnim proteinima, standardom i blank-om, 5 min na sobnoj temperaturi. ApSORbanca je očitana na 595 nm korišćenjem UltroSpec 3300 pro uređaja (Amersham Biosciences, Cambridge, Velika Britanija). Nepoznata koncentracija proteina utvrđena je iz standardne krive.

### 3.12.3. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

Elektroforeza proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) vršena je po prethodno opisanoj metodi (Laemmli, 1970). Uzorci ukupnih proteina neindukovane i indukovane bakterijske kulture (opisano u odeljku 3.12.1.) pripremljeni su obaranjem ćelija ( $15871 \times g$ , 2 min, Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), a talog je zatim resuspendovan u puferu za uzorak (2% SDS, 20% glicerol, 0,05% brom fenol plavo, 10%  $\beta$ -merkaptoetanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8). Uzorci su podvrgnuti ultrazvuku (10 pulseva, 10 s, 50 kHz; MSE Soniprep 150, London, Velika Britanija), a potom inkubirani 10 min na  $95^{\circ}\text{C}$ . Sakupljene frakcije nakon prečišćavanja rekombinantnih proteina su takođe resuspendovane u puferu za uzorak i izložene temperaturnoj denaturaciji.

SDS-PAGE sastojao se od diskontinuiranog sistema gelova, koga čine gel za koncentrovanje i gel za razdvajanje. Gel za koncentrovanje činile su sledeće komponente: 4% akrilamid/bisakrilamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Komponente u gelu za razdvajanje bile su: 12,5% akrilamid/bisakrilamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% amonijum persulfat i 0,05% TEMED. Korišćen je sistem za vertikalnu elektroforezu kompanije Bio-Rad "Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra handcast systems" (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD).

Pufer za elektroforezu sastojao se od 25 mM Tris-a pH 8,3, 186 mM glicina i 0,1% SDS-a. Elektroforeza je vršena pri konstantnom naponu od 200 V, u trajanju od 45 min. Nakon razdvajanja, proteini su fiksirani i bojeni 0,25% Coomassie brilliant blue R-250 bojom (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) u rastvoru sastava: 45% metanol, 10% sirćetna kiselina i 45% voda, uz konstantno mešanje od 1-2 h. Odbojavanje gelova vršeno je u rastvoru koji sadrži: 20% metanol, 10% sirćetnu kiselinu i 70% vode, uz konstantno mešanje. Rastvor za odbojavanje menjan je svakih 3-4 h do potpunog obezbojavanja pozadine gela.

### 3.13. Metode rada sa RNK molekulima bakterija

#### 3.13.1. Kultivacija bakterija za potrebe izolacije RNK

Model sistem *P. aeruginosa* MMA83 tretiran etil-acetatnim ekstraktom supernatanta soja *D. tsuruhatensis* 11304 (QSI ekstrakt) (5 mg/ml) kao i rekombinantnim enzimima YtnP i Y2-aiiA (pojedinačno i u kombinaciji, finalna koncentracija 10 µg/ml) inokulisan je u MH medijumu i kultivisan 12 h (do dostizanja stacionarne faze rasta) na 37°C, uz intenzivnu aeraciju. Ista zapremina DMSO (sadržana u koncentraciji ekstrakta od 5 mg/ml) i 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 koji sadrži 50% glicerol (ekvivalent zapremini rekombinantnih enzima) dodata je u pozitivnu kontrolu. Po isteku kultivacije, ćelije su oborene centrifugiranjem (15871 × g, 2 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) i potom korišćene za izolaciju RNK.

Prekonoćna kultura kliničkog izolata *B. cepacia* BCC4135 razblažena je do gustine od 0,05 McFarland-a, inokulisana u LB medijumu, nakon čega je usledila kultivacija na 37°C, narednih 24 h, uz intenzivnu aeraciju. Alikvoti bakterijskih ćelija sakupljani su u različitim vremenskim tačkama koje odgovaraju ranoj (2 h), srednjoj (6 h), kasnoj logaritamskoj (8 h), stacionarnoj (12) i kasnoj stacionarnoj fazi (24 h). Ćelije su potom oborene (15871 × g, 2 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) i korišćene za izolaciju RNK.

#### 3.13.2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija

Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija vršena je upotrebom komercijalnog kita "RNeasy Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Nemačka) uz manje izmene protokola. Nakon sakupljanja ćelijskog taloga, usledila je enzimska liza resuspendovanjem u 100 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6), uz dodatak lizozima (15 mg/ml; Serva, Heidelberg, Nemačka) i proteinaze K (20 mg/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), uz inkubaciju od 1 h na 37°C. Po dodavanju 96% etanola (250 µl), ćelijski lizat je prebačen u kolone i oboren (15871 × g, 15 s; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). RNK vezana za membranu kolone oprana je dodavanjem 700 µl RW1 pufera (15871 × g, 15 s; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), a potom dodavanjem 500 µl RPE pufera dva puta (prvo centrifugiranje 15 s, drugo centrifugiranje 2 min, 15871 × g; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). RNK je eluirana sa membrane kolone nalivanjem 30 µl dejonizovane vode bez RNaza i centrifugiranjem (15871 × g, 1 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka).



### 3.13.3. Prečišćavanje bakterijske RNK od DNK molekula

RNK izolovana iz bakterijskih ćelija prečišćena je od zaostale DNK upotrebom komercijalnog kita "Ambion DNA-free™ Kit" (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Degradacija zaostale DNK vršena je inkubacijom RNK uzoraka u rastvoru  $1 \times$  DNaza I pufera i  $1 \mu\text{l}$  DNaze I, 1 h na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon završetka inkubacije, dodato je  $1/10$  volumena DNaza I inaktivacionog reagensa, uz lagano mešanje a zatim centrifugiranje ( $15871 \times g$ , 90 s; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Supernatant sa RNK prebačen je u nove mikrotube.

### 3.13.4. Reverzna transkripcija RNK

Prečišćena bakterijska RNK prevedena je u komplementarnu DNK (cDNK) upotrebom komercijalnog kita "RevertAid RT Reverse Transcription Kit" (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

U prvom koraku reverzne transkripcije pripremljena je smeša koja je sadržala RNK kao matricu (500 ng), nasumične heksamere ( $1 \mu\text{l}$ ) i dejonizovanu vodu bez RNaze (finalna zapremina  $12,5 \mu\text{l}$ ). U cilju denaturacije potencijalnih sekundarnih struktura RNK, smeša je inkubirana 5 min na  $65^\circ\text{C}$ , korišćenjem uređaja Eppendorf 5345/5340 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

U drugom koraku u smešu je dodat  $1 \times$  reakcioni pufer, RNazni inhibitor ( $20 \text{ U}/\mu\text{l}$ , Ribolock), smeša dNTP ( $1 \text{ mM}$ ) i reverzna transkriptaza ( $200 \text{ U}/\mu\text{l}$ ), do finalne zapremine od  $20 \mu\text{l}$ . Reverzna transkripcija izvršena je u sledećim uslovima reakcije: 10 min na  $25^\circ\text{C}$ , 60 min na  $42^\circ\text{C}$ , 10 min na  $70^\circ\text{C}$  (Eppendorf 5345/5340 Mastercycler, Hamburg, Nemačka). Istovremeno je postavljena kontrolna reakcija koja sadrži sve prethodno navedene komponente izuzev reverzne transkriptaze, u cilju provere potencijalne kontaminacije uzorka sa DNK.

Uspešnost prevođenja bakterijske RNK u cDNK, kao i potvrda odsustva DNK u uzorcima, proverena je PCR metodom za konstitutivno eksprimirane gene *rpsL* (*P. aeruginosa*) i *lepA* (*B. cepacia*). PCR reakciona smeša pripremljena je prema prethodno opisanoj metodi (odjeljak 3.7.6.). Sekvence prajmera gena od interesa predstavljane su u Tabeli 4. Za umnožavanje *rpsL* i *lepA* sekvenci primenjen je sledeći program: inicijalna denaturacija 5 min na  $95^\circ\text{C}$ ; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije 30 s na  $95^\circ\text{C}$ ; hibridizacije 30 s na  $53^\circ\text{C}$  (za *rpsL*) i  $57^\circ\text{C}$  (za *lepA*) i elongacije 30 s na  $72^\circ\text{C}$ ; poslednji ciklus elongacije 7 min na  $72^\circ\text{C}$  (Eppendorf 5345/5340 Mastercycler, Hamburg, Nemačka).

### 3.13.5. Kvantitativni PCR u realnom vremenu - RT-qPCR

Transkripciona analiza gena uključenih u QS sistem (*P. aeruginosa*, *B. cepacia*) kao i QQ sistem (*B. cepacia*) vršena je kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu (eng. *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR).

Analizirani geni uključeni u QS sistem *P. aeruginosa* MMA83 deo su tri QS mreže *las*, *rhl* i *pqs* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *mvfR*). Prajmeri za umnožavanje ciljnih cDNK prikazani su u Tabeli 4.

Analizirani su, takođe, regulatorni geni koji čine deo QS (*anoI*, *anoR*) i QQ sistema (*ytnP*, *y2-aiiA*) kliničkog izolata *B. cepacia* BCC4135. Prajmeri su prikazani u Tabeli 4.

Za RT-qPCR analizu korišćen je komercijalni kit "FastGene IC Green 2 × qPCR Universal Mix" (Nippon Genetics, Dueren, Nemačka). Reakcionu smešu činile su sledeće komponente: 1 µl sintetisane cDNK, 20 ng svakog od odgovarajućih prajmera, 1 µl Rox Low referentne boje, 1 × IC Green 2 × qPCR Universal Mix, i bidestilovana voda do finalne zapremine od 10 µl. Analiza je vršena upotrebom aparata 7500 Real-Time PCR System Thermocycler (Applied Biosystems, Waltham, Masačusets, SAD) prema sledećim uslovima reakcije: inicijalna denaturacija na 95°C/2 min i 40 ciklusa sukcesivne denaturacije na 95°C/5 s; hibridizacije i elongacije na 60°C/32 s. Apsolutnom kvantifikacijom utvrđena je efikasnost korišćenih prajmera kao i odgovarajuća koncentracija cDNK. Vrednosti relativne transkripcije ciljnih gena utvrđene su  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodom (Livak & Schmittgen, 2001).

Dobijene vrednosti normalizovane su u odnosu na endogene kontrole - gen *rpsL* koji kodira protein ribozoma (*P. aeruginosa* MMA83) i *lepA* gen koji kodira elongacioni faktor 4 translacije (*B. cepacia* BCC4135). Kao kalibratori korišćeni su netretirana kontrola za *P. aeruginosa* MMA83 i uzorak iz rane eksponencijalne faze rasta za *B. cepacia* BCC4135. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

**Tabela 4.** Spisak prajmera za RT-qPCR analizu korišćenih u ovoj tezi.

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina fragmenta (bp)	Literatura
<i>anoI</i>	Forward	GGATCTAGGGCGCTATCGG	145	Ovo istraživanje
	Reverse	GGCGTTTCGCGCAAACACG		
<i>anoR</i>	Forward	CATTCGCGTGCCGCTGCCGG	150	Ovo istraživanje
	Reverse	GCGATCTGGTCGACGTCCGG		
<i>ytnP</i>	Forward	GATGGCTACCTACCGCGAG	134	Ovo istraživanje
	Reverse	GATGAGCACGGTGCGGCCCG		
<i>y2-aiiA</i>	Forward	GGCAGCCTGCGGATCGTCG	123	Ovo istraživanje
	Reverse	GCCGGTATCGACCAGGAACG		
<i>lepA</i>	Forward	GGCGATACCGTCACGCATG	138	Ovo istraživanje
	Reverse	GTTTCAGCTTCAGCTTCTCG		
<i>lasI</i>	Forward	GCGTGCTCAAGTGTTCAAGG	125	Ovo istraživanje
	Reverse	GGGCTTCAGGAGTATCTTCCTGG		
<i>lasR</i>	Forward	CTGTGGATGCTCAAGGACTAC	133	El-Shaer et al., 2016
	Reverse	AACTGGTCTTGCCGATGG		
<i>rhlI</i>	Forward	CCATCCGCAAACCCGCTACATC	151	Ovo istraživanje
	Reverse	CTCCCAGACCGACGGATCGCTCGGC		
<i>rhlR</i>	Forward	GGGCGTGTTGCGCCGTCCTGG	143	Ovo istraživanje
	Reverse	GGTATCGCTCCAGCCAGGCCTTG		
<i>pqsA</i>	Forward	GACCGGCTGTATTCGATTC	74	El-Shaer et al., 2016
	Reverse	GCTGAACCAGGGAAAGAAC		
<i>mvfR</i>	Forward	GTCGGGACGGCTACAAGGTCG	129	Ovo istraživanje
	Reverse	GATTGCGCGGACCCTTGTTGAG		
<i>rpsL</i>	Forward	GCAACTATCAACCAGCTGGTG	231	Ovo istraživanje
	Reverse	GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG		

### 3.14. Funkcionalna karakterizacija *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta i *B. cepacia* BCC4135 QQ enzima na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83

#### 3.14.1. Uticaj bioaktivnih molekula na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83

##### 3.14.1.1. Kristal violet bojenje

U svrhu određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na slobodnoživuće (planktonske) ćelije *P. aeruginosa* MMA83 primenjena je mikrodiluciona metoda. Serijom dvostrukih razblaženja pripremljene su različite koncentracije ekstrakta (počev od 5 mg/ml do 0,038 mg/ml), koji je potom inokulisan sa  $2 \times 10^5$  CFU/ml *P. aeruginosa* MMA83 u mikrotitar pločama sa ravnim dnom koje sadrže 96 bunarića (eng. *96-well plate*; Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Vrednost MIK definisana je kao najniža koncentracija na kojoj je inhibiran rast bakterija. Broj CFU/ml utvrđen je serijom desetostrukih razblaženja nakon 24 h inkubacije na 37°C (odeljak 3.4.1). Pozitivna kontrola sadržala je istu količinu DMSO kao i uzorak 5 mg/ml QSI ekstrakta. Eksperiment je rađen u šestoplikatu uz tri nezavisna ponavljanja.

Nakon toga, bunarići su oprani tri puta PBS puferom (eng. *phosphate-buffered saline*; 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), kako bi se uklonile planktonske ćelije. Fiksiranje vezanih ćelija za dno bunarića postignuto je sušenjem ploče na 65°C u trajanju od 20 min. Usledilo je nalivanje 0,1% kristal violet boje (eng. *crystal violet*; HiMedia Labs Pvt. Ltd., Indija) i inkubacija 30 min, na sobnoj temperaturi, u svrhu bojenja formiranog biofilma. Nevezana boja odstranjena je ispiranjem PBS puferom (tri puta), a potom je usledila resolubilizacija boje vezane za bakterijske ćelije (1 h uz lagano mešanje) rastvaračem koji sadrži 96% etanol i aceton u odnosu 4:1 (Stepanovic et al., 2007). Kvantifikacija formiranja biofilma izvršena je merenjem apsorbance na 595 nm upotrebom uređaja Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija).

##### 3.14.1.2. Fluorescentna mikroskopija

Uticaj bioaktivnih molekula na formiranje (*D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt i *B. cepacia* BCC4135 QQ enzimi) i dekompoziciju formiranog biofilma (*D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt) kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 vizuelno je praćen upotrebom fluorescentne mikroskopije. Za posmatranje biofilmova korišćene su SYTO9 (TermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD) i propidijum jodid (eng. *propidium iodide*, PI; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) fluorescentne boje.

*P. aeruginosa* MMA83 ćelije ( $2 \times 10^5$  CFU/ml) tretirane su sa 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta, i inokulisane u MH medijumu upotrebom mikrotitar ploča sa 24 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Na dno bunarića postavljena su sterilna pokrovna mikroskopska stakla koja su prelivena sa 1 ml prethodno pripremljene suspenzije. Po završetku inkubacije (24 h, na 37°C), planktonske ćelije oprane su tri puta PBS puferom i usledilo je bojenje dodavanjem 200 µl PBS pufera u kome su rastvorene fluorescentne boje u finalnoj koncentraciji od 2,5 µM. Bojenje je vršeno 30 min na sobnoj temperaturi u odsustvu svetlosti (usled fotosenzitivnosti fluorescentnih boja). Nevezana boja je potom uklonjena ispiranjem PBS puferom i spremljen je preparat za mikroskopiranje prebacivanjem pokrovnog stakla na mikroskopsku pločicu. Kako bi se

eliminirao biološki uticaj DMSO u eksperimentu, pozitivna kontrola tretirana je istom količinom DMSO prisutnom u 5 mg/ml QSI ekstrakta.

U svrhu praćenja uticaja *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na dekompoziciju formiranog biofilma, test soj *P. aeruginosa* MMA83 kultivisan je 24 h, na 37°C, u mikrotitar pločama sa sterilnim mikroskopskim staklom. Po isteku inkubacije, suspenzija je odlivena i usledilo je pranje PBS puferom (tri puta), a zatim je izvršen tretman ekstraktom (5 mg/ml). Nakon narednih 24 h inkubacije (ukupno 48 h), ćelije su oprane i bojenje je izvršeno po prethodno opisanom protokolu.

Analiza uticaja *B. cepacia* BCC4135 QQ enzima na formiranje biofilma praćena je tretmanom *P. aeruginosa* MMA83 (na prethodno opisan način) sa YtnP i Y2-aiiA rekombinantnim enzimima (finalna koncentracija 10 µg/ml). Pripremi mikroskopskog preparata pristupljeno je po isteku inkubacije (24 h, 37°C). Pozitivna kontrola inkubirana je sa odgovarajućom količinom 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 sa 50% glicerolom u svrhu eliminacije njegovog uticaja na formiranje biofilma. Paralelno je praćen uticaj rekombinantnih enzima na rast *P. aeruginosa* MMA83 prema ranije opisanoj metodi (odjeljak 3.14.1.1.).

Neopredno nakon pripreme preparata, obojene bakterijske ćelije posmatrane su na Olympus BX51 fluorescentnom mikroskopu (Applied Imaging Corporation, San Jose, Kalifornija, SAD) pod uveličanjem od 20000 uz korišćenje adekvatnih filtera za detekciju SYTO9 i PI boja. Maksimum ekscitacije/emisije za SYTO9 je 480/500 nm, a za PI 490/635 nm. Dobijene mikrografije analizirane su upotrebom softverskog paketa Cytovision verzija 3.1 (Applied Imaging Corporation, San Jose, Kalifornija, SAD).

### 3.14.2. Efekat kombinacije *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta i antibiotika na rast *P. aeruginosa* MMA83

Kombinovani efekat *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta i odabranih, klinički relevantnih antibiotika na rast *P. aeruginosa* MMA83 praćen je mikrodilucionom metodom. Serije dvostrukih razblaženja meropenema (2,048; 1,024; 0,512; 0,256; 0,128; 0,064; 0,032; 0,016; 0,008; 0,004 i 0,002 mg/ml) i gentamicina (4,096; 2,048; 1,024; 0,512; 0,256; 0,128; 0,064; 0,032; 0,016; 0,008; 0,004 i 0,002 mg/ml) ukrštane su sa serijom dvostrukih razblaženja 11304 QSI ekstrakta (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,076 i 0,038 mg/ml) i DMSO (16, 8, 4, 2, 1, i 0,5%). Različite koncentracije DMSO izražene su u mg/ml (16% DMSO odgovara 145,45 mg/ml, itd.) kako bi se izračunao krajnji rezultat frakcione inhibitorne koncentracije. Mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) nalivane su bakterijskom suspenzijom do postizanja finalnog broja ćelija od  $2 \times 10^5$  CFU/ml. Ćelijska gustina merena je na OD<sub>600</sub> upotrebom uređaja Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija) nakon 24 h inkubacije na 37°C. Eksperiment je rađen u triplicatu uz dva nezavisna ponavljanja.

Frakciona inhibitorna koncentracija (FIK) utvrđena je prema prethodno opisanoj metodi šahovske table (eng. *checkerboard method*; Odds, 2003). FIK predstavlja recipročni odnos MIK vrednosti kombinacije antibiotika i neantibiotskog agensa i pojedinačne MIK vrednosti antibiotika ili drugog antimikrobnog (neantibiotskog) agensa. Dobijeni rezultat definisan je kao sinergistički efekat ukoliko je zbir dve FIK vrednosti (FIK antibiotika i FIK ekstrakta ili DMSO)  $\text{bio} \leq 0,5$ ; aditivni efekat ukoliko je  $0,5 < \sum \text{FIK} \leq 1$ ; indiferentan  $1 < \sum \text{FIK} < 4$ ; ili antagonistički sa odnosom  $\sum \text{FIK} > 4$ .

### 3.14.3. Uticaj biogenih molekula na produkciju elastaze

Praćenje uticaja biogenih molekula poreklom iz sojeva *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 na produkciju elastaze kao značajnog faktora virulencije kod *P. aeruginosa* odgovornog za invaziju tkiva domaćina vršeno je prema prethodno opisanoj metodi (Alipour et al., 2010).

Supernatant soja *P. aeruginosa* MMA83 pripremljen je centrifugiranjem prekonoćne kulture (15871 × g, 15 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), a zatim je tretiran serijom dvostrukih razblaženja *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta (počevši od 5 mg/ml do 0,038 mg/ml) i u suspenziju je dodat supstrat Elastin-Congo red (finalna koncentracija 2 mg/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD). Nakon 48 h inkubacije (37 °C, 180 rpm), smeša je oborena (15871 × g, 20 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) i elastazna aktivnost u supernatantu merena je na apsorbanci od 495 nm upotrebom uređaja Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Netretirani supernatant u koji je dodat Elastin-Congo red služio je kao kontrola (uz dodatak iste koncentracije DMSO prisutne u 5 mg/ml QSI ekstrakta). Smanjenje produkcije elastaze izraženo je procentualno u odnosu na netretiranu kontrolu. Eksperiment je rađen u triplikatu.

Efekat rekombinantnih enzima YtnP i Y2-aiiA na elastaznu aktivnost praćen je tretmanom supernatanta soja *P. aeruginosa* MMA83 sa koncentracijom enzima od 10 µg/ml. Eksperiment je izveden na prethodno opisan način. Netretirani supernatant korišćen je kao kontrola (uz dodatak 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 sa 50% glicerola). Eksperiment je rađen u triplikatu.

### 3.14.4. Uticaj biogenih molekula na produkciju piocijanina

Praćenje uticaja biogenih molekula poreklom iz sojeva *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 na produkciju pigmenta piocijanina od strane *P. aeruginosa* rađeno je prema prethodno opisanoj metodi (Essar et al., 1990; Saha et al., 2008).

Ekstrakcija piocijanina vršena je iz supernatanta prekonoćne kulture soja *P. aeruginosa* MMA83 prethodno tretiranog *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstraktom (serijom dvostrukih razblaženja od 5 mg/ml do 0,038 mg/ml) i rekombinantnim enzimima YtnP i Y2-aiiA (finalna koncentracija 10 µg/ml). U supernatante dobijene centrifugiranjem prekonoćnih kultura (15871 × g, 15 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) dodat je hloroform u odnosu 1:2. Nakon intenzivnog mešanja, a potom i centrifugiranja (15871 × g, 5 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), piocijanin je ekstrahovan frakcijom koja sadrži hloroform. Usledila je druga ekstrakcija piocijanina iz hloroform faze dodavanjem 0,2 N HCl (u odnosu 3:1). Količina ekstrahovanog piocijanina utvrđena je merenjem apsorbance na 520 nm upotrebom Plate Reader Infinite 200 pro uređaja (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Koncentracija piocijanina izražena je množenjem vrednosti apsorbance ( $A_{520}$ ) korekcionim koeficijentom 17,072. Neteretirane prekonoćne kulture uz dodatak DMSO (ista koncentracija prisutna u 5 mg/ml ekstrakta) i 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 sa 50% glicerola (u istoj koncentraciji kao u puferu rekombinantnih enzima) služile su kao negativne kontrole. Smanjenje produkcije piocijanina izraženo je procentualno u odnosu na netretirane kontrole. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

### 3.14.5. Uticaj biogenih molekula na produkciju ramnolipida

Praćenje uticaja biogenih molekula poreklom iz sojeva *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 na produkciju surfaktanta ramnolipida od strane *P. aeruginosa* rađeno je prema prethodno opisanoj metodi (Rienzo et al., 2016).

Supernatanti prethodno gajenog *P. aeruginosa* MMA83 soja inokulisanog sa *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstraktom i YtnP i Y2-aiiA rekombinantnim enzimima na način opisan u odeljku 3.14.3, zakišeljani su dodavanjem HCl do dostizanja vrednosti pH 2,0. Produkcija ramnolipida praćena je spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 570 nm upotrebom Plate Reader Infinite 200 pro uređaja (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Netretirani supernatanti prekonocćnih kultura uz dodatak DMSO ili 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 sa 50% glicerola služili su kao kontrole. Smanjenje produkcije ramnolipida izraženo je procentualno u odnosu na netretirane kontrole. Eksperimenti su rađeni u triplikatu.

### 3.15. Esej bioluminiscencije

Esej bioluminiscencije primenjen je u svrhu praćenja uticaja rekombinantnih enzima YtnP i Y2-aiiA na *las* i *rhl* QS puteve *P. aeruginosa* (Duan & Surette, 2007; Massai et al., 2011).

Prekonocćne kulture reporterskih sojeva *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-*rhlA* i *P. aeruginosa* PA14-R3 razblažene su do optičke gustine od 0,05 McFarland-a, i inkubirane sa YtnP i Y2-aiiA rekombinantnim enzimima (finalna koncentracija 10 µg/ml) u prisustvu C4-HSL (N-butiril-DL-homoserin lakton), 3-okso-C12-HSL (N-3-okso-dodekanoil-L-homoserin lakton) i C14-HSL autoinducera (N-tetradekanoil-DL-homoserin lakton) u finalnoj koncentraciji od 50 µM. Esej bioluminiscencije praćen je u crnim mikrotitar pločama sa 96 bunarića, ravnog prozirnog dna (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u finalnoj zapremini suspenzije od 200 µl po bunariću. Nakon 4 h inkubacije (37°C, 70 rpm), istovremeno je merena bioluminiscencija (eng. *light counts per second*, LCPS) i ćelijska gustina (OD<sub>600</sub>) upotrebom uređaja Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Ćelijske suspenzije bez tretmana rekombinantnim enzimima (uz dodatak 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 sa 50% glicerola) korišćene su kao kontrola. Vrednosti bioluminiscencije normalizovane su u odnosu na ćelijsku gustinu. Eksperimenti su rađeni u šestoplikatu uz tri nezavisna ponavljanja.

### 3.16. Termostabilnost bioaktivnih molekula

U cilju ispitivanja fizičkih svojstava bioaktivnih molekula, prekonocćna kultura *D. tsuruhatensis* 11304 kao i supernatant dobijen centrifugiranjem (15871 × g, 15 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) i filtriranjem (filter 0,22 µm, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) inkubirani su na 100°C u trajanju od 30 i 60 min. Kao pozitivna kontrola korišćena je netretirana kultura, a kao negativna LB medijum. Svojstvo termostabilnosti ispitano je prethodno opisanim testom difuzije u bunarićima (odeljak 3.4.1.).

Test termostabilnosti primenjen je, takođe, u svrhu ispitivanja fizičkih svojstava rekombinantnih enzima YtnP i Y2-aiiA. Prečišćeni enzimi (finalna koncentracija 10 µg/ml) preinkubirani su na različitim temperaturama u opsegu od 30 do 100°C (sa intervalima od 10°C) u trajanju od 30 min. Nakon hlađenja (5 min na ledu), C6-HSL (finalna koncentracija 0,5 mM) dodat je u reakcioni pufer (20 mM Tris-HCl pH 7,4) i reakciona smeša je potom inkubirana na 37°C narednih 30 min. Preostala AHL koncentracija relativno je kvantifikovana primenom *C. violaceum* CV026 biosenzor soja (odeljak 3.4.2.). Aktivnost rekombinantnih enzima izražena je kao recipročna vrednost preostalog C6-HSL inducera. Eksperiment je rađen u triplikatu.

### 3.17. Biohemijske metode

#### 3.17.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)

Tankoslojna hromatografija (eng. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) primenjena je u svrhu razdvajanja komponenata *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta. TLC je izvođen na hromatografskim aluminijumskim pločama (0,25 mm, Silika gel 60, F<sub>254</sub>; Merck, Darmstadt, Nemačka).

Uzorak je nanet na startnu liniju TLC ploče (1 mg suvog ekstrakta rastvorenog u 100 µl etil-acetata), a potom razdvajan upotrebom smeše rastvarača hloroform i etil-acetat u odnosu 5:4 (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD). Nakon razdvajanja, TLC ploča je osušena a potom je jedan deo preliven *C. violaceum* CV026 biosenzor sojem (odeljak 3.4.1.) kako bi se utvrdio položaj bioaktivnog molekula na TLC ploči odgovornog za ispoljavanje QQ fenotipa.

Ostatak TLC ploče ogreban je u nivou položaja bioaktivnog molekula, i silika gel je nanet na kolonu napunjenu pamukom. Uzorak je zatim eluiran sa silika gela upotrebom etil-acetata i osušen strujanjem vazduha na sobnoj temperaturi.

#### 3.17.2. Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (MALDI) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom

Instrumentalna metoda matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (eng. *Mass Spectrometry*, MS) primenjena je za strukturnu karakterizaciju ekstrakta *D. tsuruhatensis* 11304.

MS strukturna analiza izvršena je upotrebom ABSCIEX TOF/TOF<sup>TM</sup> 5800 masenog spektrometra (Applied Biosystems, Waltham, Masačusets, SAD) sa laserskim detektorom Nd:YLF ( $\lambda = 345$  nm), brojem pulseva podešenim na  $< 500$  ps i uz frekvenciju do 1000 Hz.

Osušeni uzorak dobijen nakon razdvajanja 11304 QSI ekstrakta na TLC ploči (prethodni odeljak) rastvoren je primenom sledećih organskih rastvarača: acetonitrila (ACN), etil-acetata ili direktnim rastvaranjem u rastvoru MALDI matriksa  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetroj kiselinu (eng.  *$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid*, CHCA; 5 mg/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) uz dodatak 0,1% ACN/TFA (trifluorsirćetna kiselina) u odnosu 7:3 (Leipert et al., 2017). Pripremljeni ekstrakt (0,5 µl) i rastvor matriksa (CHCA, 0,5 µl) pomešani su i potom naneseni na ploču od nerđajućeg čelika. Smeša



je osušena na sobnoj temperaturi, a zatim analizirana. Svaki dobijeni spektar, snimljen u pozitivnom refleksionom modu, bio je rezultat akumulacije 2000 pulseva lasera, dok je za fragmentaciju i analizu primenom masenog spektrometra akumulirano 2500 pulseva.

### 3.17.3. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Supstratna specifičnost *B. cepacia* BCC4135 QQ enzima za različite AHL ispitana je upotrebom tečne hromatografije visokih performansi (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Različiti komercijalni homoserin laktoni (od 4 do 14 C atoma) (Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) korišćeni su kao supstrati za ispitivanje aktivnosti YtnP i Y2-aiiA enzima. C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL (N-oktanoil-DL-homoserin lakton), C10-HSL (N-dekanoil-DL-homoserin lakton), 3-okso-C12-HSL (rastvoreni u metanolu) i C14-HSL (rastvoren u n-propanolu i metanolu u odnosu 1:1) razblaženi su u 20 mM Tris-HCl puferu pH 7,4 u finalnoj koncentraciji od 1 mM AHL i 5% metanola. Uzorci rekombinantnih enzima (10 µg/ml, finalna koncentracija), inkubirani su sa odgovarajućim AHL 30 min na 37°C. Produkti reakcije smeše ekstrahovani su etil-acetatom (dva puta), upareni i ponovo rastvoreni u metanolu visokog stepena čistoće (eng. *HPLC grade*; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD). NaOH (1 M) je korišćen kao kontrola hidrolize N-acil-homoserin laktona (Mei et al., 2010).

Filtrirani uzorci (upotrebom 10 kDa filtera; Amicon Ultra, Merck Milipore Ltd., Kork, Irska) analizirani su na instrumentu UltiMate™ 3000 UHPLC System (Thermo Scientific, Waltham, Masačusets, SAD) sa UV/VIS detektorom (eng. *UV/visible light*) podešenim na talasnoj dužini od 205 nm. Korišćena je Hypersil GOLD kolona sa C18-silikatnim matriksom, dimenzija 150 × 4,6 mm (Thermo Scientific, Waltham, Masačusets, SAD). Uzorci su eluirani sa kolone pri konstantnom protoku 0,5 ml/min i upotrebom metanola i bidestilovane vode (prethodno filtrirane upotrebom filtera 0,22 µm; Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) kao eluenata prema sledećem programu: 2 min 20:80 metanol/voda; 2 min 30:70 metanol/voda; 2 min 40:60 metanol/voda; 2 min 50:50 metanol/voda; 2 min 60:40 metanol/voda; 2 min 70:30 metanol/voda; 10 min 80:20 metanol/voda; 1 min 70:30 metanol/voda; 1 min 60:40 metanol/voda; 1 min 50:50 metanol/voda; 1 min 40:60 metanol/voda; 1 min 30:70 metanol/voda; 3 min 20:80 metanol/voda.

Dobijeni hromatogrami analizirani su primenom softverskog programa Thermo Scientific Chromeleon™ Chromatography Data System (Thermo Scientific, Waltham, Masačusets, SAD).

## 3.18. Ispitivanje citotoksičnog efekta *B. cepacia* BCC4135 laktonaza na ćelijskoj liniji humanih keratinocita

### 3.18.1. Tretman humanih HaCaT keratinocita sa *B. cepacia* BCC4135 laktonazama

Ćelijska linija humanih keratinocita HaCaT kultivisana je u DMEM (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) medijumu sa visokom koncentracijom glukoze (4500 mg/ml) i dodatno obogaćenim 2 mM L-glutaminom, 10% fetalnim goveđim serumom, 100 U/ml penicilinom i 100 µg/ml

streptomycinom (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Nakon odmrzavanja iz tečnog azota, ćelije su gajene u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup> (T-25, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) na 37°C preko noći u CO<sub>2</sub> inkubatoru (5% CO<sub>2</sub>). Tripsin rastvoren u PBS puferu (0,25%) sa dodatkom 1 mM EDTA korišćen je za odlepljivanje ćelija sa površine flaska.

Tretman HaCaT keratinocita ( $2 \times 10^4$  CFU/ml) rekombinantnim enzimima YtnP i Y2-*aiiA* (finalna koncentracija 10 µg/ml) vršen je u mikrotitar pločama sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) u trajanju od 24 h u odgovarajućim uslovima (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

### 3.18.2. Test citotoksičnosti laktonaza soja *B. cepacia* BCC4135

Nivo citotoksičnosti YtnP i Y2-*aiiA* rekombinantnih enzima utvrđen je upotrebom LDH (eng. *Lactate Dehydrogenase*) eseja. Citotoksičnost BCC4135 laktonaza praćena je merenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze oslobođene iz mrtvih HaCaT ćelija primenom komercijalnog kita za određivanje citotoksičnosti (Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, Masačusets, SAD). Aktivnost laktat dehidrogenaze merena je u supernatantu dobijenom nakon obaranja ćelija, po uputstvima proizvođača. Kvantifikacija oslobođene LDH izvršena je merenjem apsorbance na 490 nm upotrebom uređaja Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Beč, Austrija). Kao pozitivna kontrola korišćene su HaCaT ćelije tretirane puferom za lizu iz komercijalnog kita, dok su kao negativna kontrola korišćene HaCaT ćelije sa dodatkom 20 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 sa 50% glicerola u istoj koncentraciji kao i YtnP i Y2-*aiiA* enzimi. Eksperiment je rađen u triplicatu.

## 3.19. Bioinformatičke analize

### 3.19.1. Analiza nukleotidnih sekvenci

Sekvence dobijenih plazmida kao i sekvence *ytnP* i *y2-aiiA* gena i promotora analizirane su upotrebom DNA Strider softverskog programa verzija 2.0 fl.3. Poređenje datih sekvenci sa homolognim nukleotidnim sekvencama deponovanim u NCBI bazi podataka (eng. *National Center for Biotechnology Information*) vršeno je upotrebom BLAST algoritma (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3.19.2. Analiza celokupnog genoma

De Bruijn Graph metoda korišćena je za sastavljanje genomskih sekvenci, pri čemu su kontigovi kraći od 200 bp eliminisani (Peng et al., 2012). Sirove sekvence su mapirane i sastavljene u skafolde Burrows-Wheeler Aligner alatom (Li & Durbin, 2010). Anotacija gena i predikcija otvorenih okvira čitanja genomskih sekvenci sprovedena je korišćenjem RAST (eng. *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) servera (<http://rast.nmpdr.org>). Dobijeni podaci analizirani su upotrebom SEED baze podataka (Disz et al., 2010).

Metodom genotipizacije koja se sastoji od analize alelskih varijanti sedam gena kućepazitelja (eng. *housekeeping*) dobijen je MLST (eng. *MultiLocus Sequence Typing*) profil *Burkholderia* sp. BCC4135 korišćenog u ovoj studiji (<https://pubmlst.org/bcc/>). Svaki analizirani izolat odlikuje se sekvencnim tipom (eng. *sequence type*, ST), koji predstavlja jedinstvenu kombinaciju sedam sekvenciranih alela. MLST analizom istovremeno je izvršena identifikacija *Burkholderia* izolata do nivoa vrste.

*D. tsuruhatensis* 11304 izolat identifikovan je do nivoa vrste analizom njegove genomske sekvence korišćenjem javno dostupne baze podataka EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>; Yoon et al., 2017).

Za analizu prisustva gena koji kodiraju determinante virulencije kod selektovanih kliničkih izolata korišćena je javno dostupna platforma sa sveobuhvatnim faktorima virulencije bakterijskih patogena - *Virulence factor database* (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) (Liu et al., 2019).

Prisustvo genetičkih markera rezistencije na antibiotike u okviru sekvenciranih genoma utvrđeno je primenom javno dostupne baze podataka koja sadrži deponovane gene za rezistenciju na antibiotike - *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>) (McArthur et al., 2013).

Genomske sekvence kliničkih izolata *Delftia tsuruhatensis* 11304 i *Burkholderia cepacia* BCC4135 deponovane su u NCBI GenBank bazi podataka pod pristupnim brojevima SMMJ000000000 i JAACXU000000000, redom.

### 3.19.3. Filogenetska analiza QQ enzima

*In silico* analizom uz korišćenje BLAST algoritma pretražen je celokupan genom soja *B. cepacia* BCC4135 u svrhu potrage za potencijalnim genom/genima koji kodira/ju QQ enzim(e). Pronađene odgovarajuće sekvence upoređene su sa funkcionalno okarakterisanim QQ enzimima poreklom iz različitih bakterijskih vrsta kao i sekvencama bez dodeljene funkcije poreklom od *Burkholderia* vrsta deponovanih u UniProt bazi podataka (<https://www.uniprot.org/>). Odabrane aminokiselinske sekvence međusobno su upoređene i višestruko poravnate Clustal W (Larkin et al., 2007) algoritmom korišćenjem Vector NTI programa. Filogenetska stabla konstruisana su upotrebom MEGA softvera verzija 7.0 (Kumar et al., 2016) primenom *Neighbor-Joining* (NJ) metode. Uvid u verodostojnost dobijenih stabala dobijen je podešavanjem standardnog parametra "bootstrap" na 1000 ponavljanja.

### 3.19.4. Analiza prisustva signalne sekvence peptida

Predikciona analiza prisustva signalne sekvence kod *B. cepacia* BCC4135 QQ enzima izvršena je upotrebom SignalP verzija 5.0 javno dostupnog servera (Almagro Armenteros et al., 2019).

### **3.20. Statistička obrada podataka**

Rezultati dobijeni u ovoj studiji predstavljeni su kao srednja vrednost tri ili više ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Za statističku obradu rezultata korišćen je IBM SPSS Statistics softverski paket verzija 21.0 za Windows. Vizuelni prikaz grafika predstavljen je upotrebom GraphPad Prism softverskog paketa (GraphPad, San Diego, Kalifornija, SAD). Studentov  $t$ -test korišćen je za poređenje kontrolne i eksperimentalne grupe. Vrednosti verovatnoće  $p < 0,05$  ili manje smatrane su statistički značajnim i obeležene su sledećim simbolima: \*\*\* za  $p < 0,001$ , \*\* za  $p < 0,005$ , \* za  $p < 0,05$ .

# **Rezultati**

## 4. REZULTATI

### 4.1. Selekcija kliničkih izolata sa *quorum quenching* (QQ) fenotipom

Ovom studijom obuhvaćena je analiza Gram-negativnih oportunističkih patogena laboratorijske kolekcije Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju (LMM) Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, u cilju potrage za utišivačima međucelijske komunikacije vrste *P. aeruginosa*. Testirani izolati poreklom su iz kliničkih ustanova sa teritorije grada Beograda.

Od ukupnog broja testiranih kliničkih patogena LMM kolekcije koju čine 633 izolata, svrstanih u 11 rodova (Prilog 1), selektovano je 19 izolata (pripadnika 5 rodova) nosioca traženog utišivačkog (QQ) fenotipa, na osnovu primene testa difuzije u bunarićima. Jedan pripadnik roda *Achromobacter*, 11 izolata *Burkholderia cepacia* kompleksa, dva *Delftia* spp., četiri *Stenotrophomonas* spp. izolata i jedan *Ralstonia* spp. izolat bili su efikasni u utišavanju međucelijske komunikacije biosenzora *Chromobacterium violaceum* CV026. Dijametar zone inhibicije produkcije ljubičastog pigmenta violaceina *C. violaceum* CV026 utvrđen je za svaki testirani izolat. U Tabeli 5 dat je detaljan prikaz naziva selektovanih sojeva kao i veličine zona inhibicije produkcije violaceina koju formiraju.

**Tabela 5.** Klinički izolati iz LMM kolekcije selektovani kao nosioci QQ fenotipa.

Rod bakterija	Naziv soja	Dijametar zone (mm)
<i>Achromobacter</i> spp.	13011	14
<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks (Bck)	BCC7	17
	BCC8	16
	BCC9	17
	BCC19	12
	BCC20	13
	BCC24	15
	BCC66	17
	BCC301	17
	BCC302	19
	BCC532	19
BCC4135	20	
<i>Delftia</i> spp.	11304	23
	6960/2	17
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	1556	11
	6646	12
	6960	15
	7451	14
<i>Ralstonia</i> spp.	630	13

Inicijalnom pretragom, naročito značajna aktivnost u smislu sprečavanja produkcije violaceina konstatovana je kod dva izolata *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135, koja su potom detaljnije analizirana u ovoj tezi. Rezultati dobijeni testom difuzije u bunarićima primenom *C. violaceum* CV026 biosenzora za ove kliničke izolate prikazani su na Slici 5.

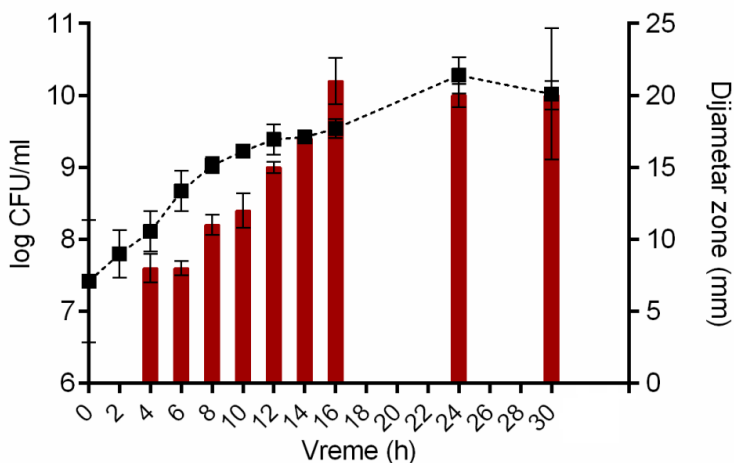


**Slika 5.** Inhibicija produkcije pigmenta violaceina biosenzor soja *C. violaceum* CV026 od strane kliničkih izolata *Delftia* sp. 11304 (1) i *Burkholderia* sp. BCC4135 (2). Kao negativna kontrola (-) korišćen je LB medijum za kultivaciju analiziranih sojeva.

#### **4.2. Zavisnost produkcije QQ molekula od faze rasta sojeva *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135**

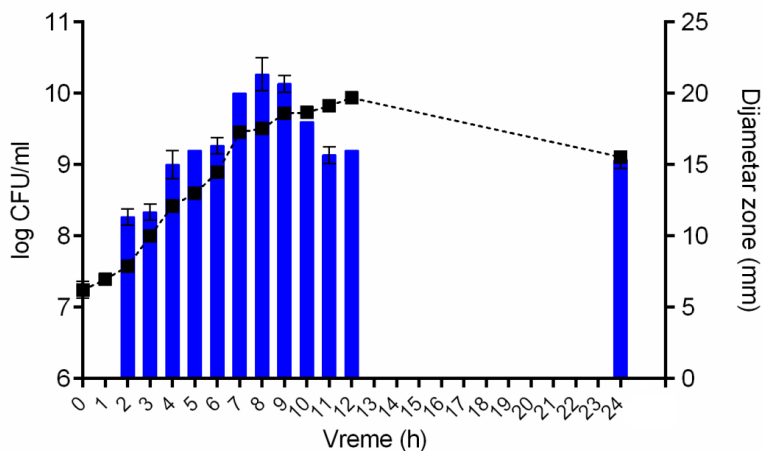
U cilju utvrđivanja zavisnosti ispoljavanja QQ fenotipa od faze rasta odabranih izolata, produkcija bioaktivnih molekula praćena je u vremenskom intervalu od 30 h za *Delftia* sp. 11304 i tokom 24 h za soj *Burkholderia* sp. BCC4135. Istovremeno je praćena vremenska zavisnost broja formiranih kolonija (CFU/ml) kako bi se konstruisala kriva rasta analiziranih sojeva.

Ispoljavanje QQ fenotipa soja *Delftia* sp. 11304 detektovano je prvi put u četvrtom satu (rana logaritamska faza), dok je maksimum aktivnosti dostignut u 16-om satu što odgovara stacionarnoj fazi rasta bakterijske kulture. Značajnu QQ aktivnost ovaj izolat zadržao je i nakon 30 h kultivacije, što može ukazivati da se ne radi samo o tranzijentnoj produkciji, već da je ona prisutna tokom svih faza rasta ili da je produkovani bioaktivni molekul stabilan (Slika 6).



**Slika 6.** Ispoljavanje QQ fenotipa kliničkog izolata *Delftia* sp. 11304 zavisno od faze rasta bakterijske kulture. Kriva rasta definisana je brojem CFU/ml u odgovarajućim vremenskim intervalima. Zavisnost QQ aktivnosti od faze rasta utvrđena je u istim vremenskim tačkama i izražena numeričkim vrednostima dobijenim merenjem zone inhibicije produkcije pigmenta violaceina biosenzor soja *C. violaceum* CV026. Crnim kvadratićima povezanim isprekidanim linijama predstavljena je logaritamska vrednost CFU/ml, dok je crvenim stubićima predstavljen dijametar zone inhibicije produkcije violaceina izražen u milimetrima.

Sposobnost interferencije sa *quorum sensing* (QS) sistemom biosenzora *C. violaceum* CV026 u zavisnosti od faze rasta bakterijske kulture ustanovljena je i kod izolata *Burkholderia* sp. BCC4135. QQ fenotip detektovan je u drugom satu (rana logaritamska faza), sa najvećom zabeleženom aktivnošću u osmom satu (kasna logaritamska faza) uz značajno ispoljavanje produkcije bioaktivnog molekula i u stacionarnoj fazi rasta (Slika 7). Sposobnost inhibicije produkcije violaceina bila je evidentna u znatnoj meri i nakon 24 h kultivacije soja *Burkholderia* sp. BCC4135.



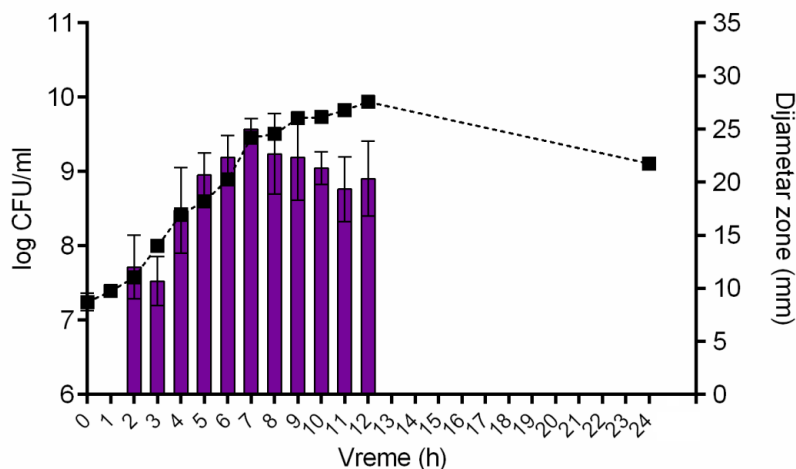
**Slika 7.** Ispoljavanje QQ fenotipa kliničkog izolata *Burkholderia* sp. BCC4135 zavisno od faze rasta bakterijske kulture. Kriva rasta definisana je brojem CFU u odgovarajućim vremenskim tačkama. Zavisnost QQ aktivnosti od faze rasta utvrđena je u istim vremenskim tačkama i izražena numeričkim vrednostima dobijenim merenjem zone inhibicije produkcije pigmenta violaceina biosenzor soja *C. violaceum* CV026. Crnim kvadratićima povezanim isprekidanim linijama



predstavljena je logaritamska vrednost CFU/ml, dok je plavim stubićima predstavljen dijametar zone inhibicije produkcije violaceina izražen u milimetrima.

#### 4.3. Vremenska zavisnost ispoljavanja QS fenotipa soja *Burkholderia* sp. BCC4135

Pored detektovanja prisustva QQ fenomena soja *Burkholderia* sp. BCC4135, ustanovljeno je da ovaj soj poseduje i QS fenotip, čije je ispoljavanje takođe uslovljeno fazom rasta bakterijske kulture.



**Slika 8.** Ispoljavanje QS fenotipa kliničkog izolata *Burkholderia* sp. BCC4135 zavisno od faze rasta bakterijske kulture. Kriva rasta definisana je brojem CFU u odgovarajućim vremenskim tačkama. Zavisnost QS aktivnosti od faze rasta utvrđena je u istim vremenskim tačkama i izražena numeričkim vrednostima dobijenim merenjem zone produkcije violaceina biosenzor soja *C. violaceum* CV026. Crnim kvadratićima povezanim isprekidanim linijama predstavljena je logaritamska vrednost CFU/ml, dok je ljubičastim stubićima predstavljen dijametar zone produkcije violaceina izražen u milimetrima.

Ispoljavanje QS aktivnosti soja BCC4135 prvi put je uočeno u ranoj logaritamskoj fazi (2 h). Maksimum QS aktivnosti utvrđen je tokom kasne logaritamske i rane stacionarne faze (Slika 8), dok prisustvo QS fenotipa nije detektovano kod 24 h (kasna stacionarna faza) stare bakterijske kulture.

#### 4.4. Genomska analiza sojeva *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135

Sa ciljem boljeg razumevanja kliničkog potencijala sojeva koji nose QQ fenotip, kao i potragom za genetičkim determinantama odgovornim za ispoljavanje ovog fenomena, urađeno je sekvenciranje celokupnih genoma. Prethodno izolovana ukupna DNK kliničkih izolata *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135 sekvencirana je uslužno primenom Illumina HiSeq 2500 platforme (MicrobesNG, IMI-School of Biosciences, Univerzitet u Birminghamu, Birmingham, Velika Britanija).

Sekvenciranjem celokupnog genoma ustanovljena je veličina genoma soja *Delftia* sp. 11304 od 6616336 bp. Sklapanje genomske sekvence rezultiralo je prisustvom 199 kontigova sa najvećim

kontigom od 337425 bp i procentom GC sastava od 66,78%. Detaljna analiza *Delftia* sp. 11304 genoma predstavljena je u Tabeli 6. Upotrebom EzBioCloud platforme soj *Delftia* sp. 11304 identifikovan je kao pripadnik *Delftia tsuruhatensis* vrste. U okviru sekvence genoma *D. tsuruhatensis* 11304 pronađen je širok repertoar različitih faktora virulencije i genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike. Među prisutnim faktorima virulencije izdvojeni su geni koji kodiraju siderofore, pioverdin, piohijelin, ornibaktin, a ustanovljeno je i prisutvo gena koji kodiraju kapsule i alginat. Rezistom ovog soja čine geni koji kodiraju efluks pumpe pripadnike RND superfamilije (eng. *Resistance-Nodulation-Division*) a koji uključuju sledeće gene: *mexF*, *mexY*, *mexB*, *mexD*, *mexI*, *mexA*, *smeB*, *smeE*, *amrB* i *mdtB*; zatim gene koji kodiraju  $\beta$ -laktamaze *bla*<sub>OXA-258</sub> i *bla*<sub>LRA-13</sub>, kao i gene za rezistenciju na spiramicin. Detaljna analiza prisustva determinanti virulencije i rezistencije data je u Prilogu 2 i Prilogu 3, redom.

Ustanovljena veličina genoma soja *Burkholderia* sp. BCC4135 iznosila je 8641314 bp. Rezultati sklapanja genomske sekvence ukazali su na grupisanje sekvenci u 434 kontiga sa najvećim kontigom od 387658 bp i GC sastavom od 66,4%. Karakteristike genoma soja BCC4135 detaljno su predstavljene u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Karakteristike genomskih sekvenci analiziranih kliničkih izolata. Podaci su dobijeni upotrebom SEED baze podataka.

Osobina	<i>Delftia</i> sp. 11304	<i>Burkholderia</i> sp. BCC4135
Veličina (bp)	6616336	8641314
GC sastav (%)	66,78	66,4
N50	67660	92029
L50	29	28
Broj kontigova	199	434
Broj podsistema	374	401
Broj kodirajućih sekvenci	6351	8630
Broj sekvenci RNK	79	78

N50 vrednost predstavlja dužinu sekvence najkraćeg kontiga na 50% ukupne veličine genoma; L50 vrednost predstavlja najmanji broj kontigova čiji zbir veličina čini polovinu veličine genomske sekvence.

MLST analizom ustanovljeno je da soj *Burkholderia* sp. BCC4135 poseduje nove alelske varijante *gltB* i *gyrB* gena kućepazitelja. Na osnovu kombinacije alelskih varijanti svih sedam konstitutivno eksprimiranih gena konstatovano je da ovaj klinički izolat odlikuje jedinstven sekvencni tip ST1485, koji je okarakterisan kao novi poređenjem sa deponovanim sekvencnim tipovima u "*Burkholderia cepacia* kompleks MLST" bazi podataka. MLST profil soja *Burkholderia* sp. BCC4135 dat je u Tabeli 7.

**Tabela 7.** MLST profil soja *B. cepacia* BCC4135. Alelske varijante sedam gena kućepazitelja vrsta pripadnika *Burkholderia cepacia* kompleksa predstavljene su u tabeli.

Genom	Geni kućepazitelji							
	<i>atpD</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>trpB</i>	ST
<i>B. cepacia</i> BCC4135	66	654	969	103	1	1	21	1485

Pored genotipizacije, MLST analizom izvršena je identifikacija kliničkog izolata *Burkholderia* sp. BCC4135 do nivoa vrste, te je ustanovljeno da ovaj soj pripada vrsti *Burkholderia cepacia*. *In silico* analizom utvrđeno je prisustvo mnoštva gena koji kodiraju faktore virulencije i genetičke markere rezistencije na antibiotike. Kao najznačajniji faktori virulencije izdvojeni su oni koji su uključeni u interakciju sa domaćinom i invaziju, QS sistem, sistem za sekreciju, formiranje biofilma, sintezu efluks pumpi i endotoksina, kao i usvajanje gvožđa. Pored toga, rezistom profil soja *B. cepacia* BCC4135 čine brojne genetičke determinante koje kodiraju efluks pumpe pripadnike RND superfamilije (*ramA*, *adeL*, *mexJ*, *mexK*, *mexS*, *mexT*, *OprZ*, *nalD*), MFS superfamilije (eng. *Major Facilitator Superfamily*; *farA*, *emrY*, *evgS*, *facT*, *qacA*, *cmrA*) AIM, AmpC i NmcA  $\beta$ -laktamaze, tetraciklin inaktivacioni enzim i streptogramin *vat* acetiltransferazu. Detaljna analiza virulom i rezistom profila soja *B. cepacia* BCC4135 data je u Prilogu 4 i Prilogu 5, redom.

#### 4.5. *B. cepacia* BCC4135 kodira dve N-acil-homoserin (AHL) laktonaze i QS sistem

*In silico* analizom anotiranog genoma BCC4135 ustanovljeno je prisustvo gena koji kodiraju dve N-acil-homoserin (AHL) laktonaze označene kao YtnP i Y2-aiiA. Osim toga, pretragom genomske sekvence detektovan je QS klaster koji sadrži *anoI* gen koji kodira AHL sintazu, *anoR* gen koji kodira transkripcioni aktivator i nekoliko gena koji kodiraju proteine za izbacivanje homoserin laktana (homoserin laktan efluks proteini) (Tabela 8). Aminokiselinske sekvence potencijalnih YtnP i Y2-aiiA laktonaza date su u Prilogu 6 i Prilogu 7, redom.

**Tabela 8.** Lista QS i QQ gena pronađenih u genomu *B. cepacia* BCC4135 *in silico* analizom.

Broj ROI <sup>1</sup>	Gen	Funkcija	Pozicija na nodu
Nod 1	<i>y2-aiiA</i>	N-acil-homoserin laktonaza	40774...41745
	<i>ytnP</i>	Pretpostavljena QQ laktonaza YtnP	263222...264067
Nod 2	<i>rhtB1</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	216121...216750
Nod 8	<i>rhtB2</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	114020...114652
Nod 26	<i>rhtB3</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	Komplement 22124...22756
Nod 39	<i>rhtB4</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	Komplement 27590...28231
Nod 40	<i>rhtB5</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	48321...48932
Nod 56	<i>rhtB6</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	21785...22432
Nod 74	<i>anoI</i>	Acil-homoserin laktan sintaza	28601...29209
	<i>anoR</i>	Transkripcioni aktivator	Komplement 27154...27873
Nod 110	<i>rhtB7</i>	Homoserin/homoserin laktan efluks protein	5256...5885

<sup>1</sup>ROI-Region Od Interesa

Aminokiselinske sekvence potencijalnih proteina AHL sintaze (AnoI) i transkripcionog aktivatora (AnoR) poreklom iz *B. cepacia* BCC4135 dele 99% identičnosti sa *Burkholderia* CepI/R QS sistemom nakon poređenja sa sekvencama dostupnim u UniProt bazi podataka.

Potencijalni QQ enzimi YtnP i Y2-aiiA sačinjeni su od 281 i 323 aminokiselina, redom, i pripadaju superfamiliji metalo- $\beta$ -laktamaza, na osnovu poređenja sa homolognim sekvencama deponovanim u NCBI bazi podataka, upotrebom BLASTp programa. Višestruka poravnanja aminokiselinskih sekvenci YtnP i Y2-aiiA sa drugim predstavnicima funkcionalno okarakterisanih AHL laktonaza ukazala su na prisustvo konsenzusnog cink-vezujućeg motiva HXHXDH (Slika 9), koji predstavlja visoko konzervisan region među predstavnicima metalo- $\beta$ -laktamaza, sa aspartatom i histidinom u aktivnom mestu neophodnim za degradaciju AHL molekula. Aminokiselinske sekvence YtnP i Y2-aiiA dele 42% identičnosti sa RmmL laktonazom (*Ruegeria mobilis*) i 43% sa laktonazom YtnP poreklom iz *Bordetella hinzii*, redom, dok međusobno dele identičnost od 37%, sa procentom pokrivenosti aminokiselinske sekvence od 93% (Slika 10A). *Neighbor-Joining* analizom YtnP i Y2-aiiA enzimi grupisani su kao pripadnici YtnP klade QQ laktonaza (Slika 10A). Dodatno, visoka sličnost na aminokiselinskom nivou uočena je među *B. cepacia* BCC4135 laktonazama i funkcionalno neokarakterisanim potencijalnim laktonazama poreklom iz drugih *Burkholderia* vrsta deponovanim u UniProt bazi podataka (Slika 10B).

```

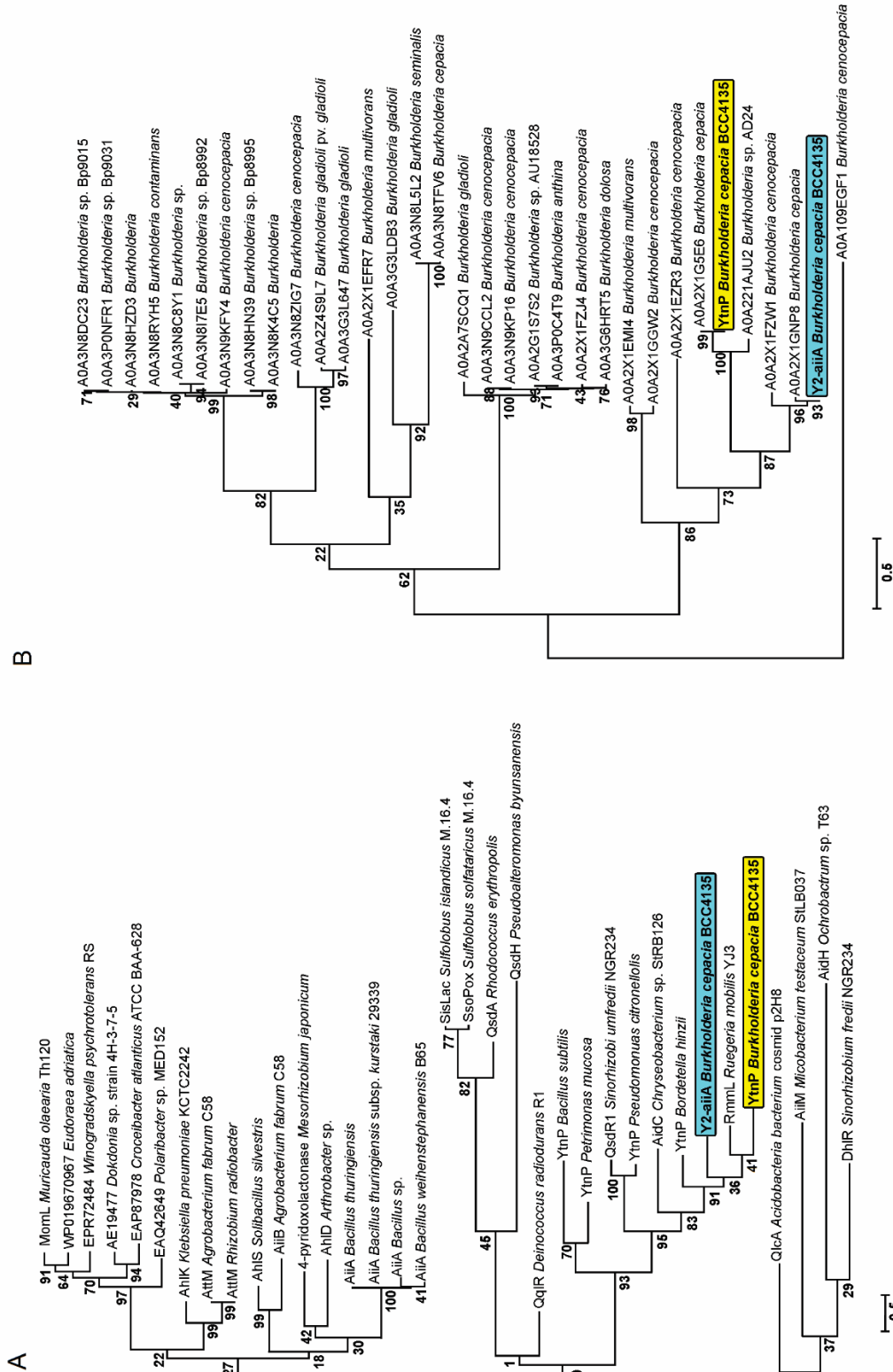
QsdR1_Sinorhizobi_umfredii_NGR234      AETNRRITGQQTETMSLDNASRPSRGRDELVPSRYAVK---GEIDVLVSDV---LPIETFLVATNADPAVR-----TAWLDDMFLPTDVLHWLWLVVLRSSGQAILVDAG-----
RmmL_Ruegeria_mobilis_YJ3             LSRRTLLKSVGLAGLAVESLGGMALAAPMAPVHLHGFLGDVITALLDGHLSLPSGMFTGADPETVAQT-----LAGTFYREDAQGLEIPVNGYLERAGQYLLIDTG-----
Y2-aiiA_Burkholderia_cepacia_BCC4135  NLNWRITGMLVIAWCFGLASAACAEPGGADQAPGFYRQGLSRLRVALSDGTHFFPVVTVFRDISKDDIR-----RDLDRAFLEPPVQGSINAFLLDGGTKRILVDSG-----
YtnP_Bacillus_subtilis                 -----MEQLQIGDKVITWIKGNTHLDGGAMFGVVPKVLWS-----RKYKHNDTNHILRTPDILLQKGNMLIDSGINGNK-----
YtnP_Bordetella_hinzii                 ---MSFARIAAALGLTLALMGGAQASPVQTAQAPGFHRMALGDVFVYALYDGYV-DLDEKVLITGASPDVQR-----LLADMFAQRASGMQTAIVNGYLNHTGSAQLVLLIDTG-----
YtnP_Burkholderia_cepacia_BCC4135     -----MATLTFPPGQQ---VGDFTTITASDGYLTASLDLFSNIDPADASN-----MQRDAGQKQPEAVHINCIVYRGAGRTVLIDAG-----
YtnP_Petrimonas_mucosa                 -----MANFHIETSYFLADGGAMFGPIFK---KY-----WQERYPCDNNMCLMAMRCLFIEIGERRILVDCG---AG-----
YtnP_Pseudomonas_citronellolis        ---MNMHLNYSVQRNSAPKNAQHQE---REELVPSRYALRV---GEIDVLVSDV---LPLETATMSTNAEPAAR-----AAWFKDMFLGPEAFDVALNVVLRSSGQAILVDAG-----

QsdR1_Sinorhizobi_umfredii_NGR234      --LGVEFPDFPRAG---QTVSRLEAAVVDLASVTDVVTIEMMDHIFGGLLDAGVKDRLRPLDLRIHVAAAEVWFWEAPDFSHASMPSTVPPVFLRRTRAKRFAEYQSQRQF-----
RmmL_Ruegeria_mobilis_YJ3             ---TAALMGPELG---GLMGAAATGVTIDQISTILLIEMHPPDRAGLLNADG-SAAFFNAELVVADAEGWGFHDDAIMASVDEGSRGFFQMARNVAVPADRMPKPFSG-----
Y2-aiiA_Burkholderia_cepacia_BCC4135  ---AGVLYGDCCG---KLLANRAAAYAEQIDEVLLIHLKDYVYSIVTNG-RMTFPNAVVRVNEIEANYWLDENKQAQAPFLASFFDAAAASVAPVVAAGRFKTRFG-----
YtnP_Bacillus_subtilis                 LNEKMKRNQGVTEE---SSVYESLEKLLKLEDIHYVLMTHLHFDRAAGSLTKGES-DHLVPAFFNAKVYVSETENNMERN-----PNTRSNRYTKENWEPIVDQVVT---
YtnP_Bordetella_hinzii                 ---AGHCFPTLG---QLDSNQAAYTAADVDVAVLITLHLPDRAAGLITPQ-GQARFPRAKVYAAAREETAWLSQPIAAAPEAARPMFAMAQAQVAPYQESGRFTAYDG---
YtnP_Burkholderia_cepacia_BCC4135     ---AGGFRQWGG---QLGTNLALAGIEFAAIDTILITLHAPDHYVGLVNGAG-EIAFFNAELVVHREVGFWDDGNLSRASERARGNFAVARRVFDAYGDRLRLFD---
YtnP_Petrimonas_mucosa                 -DKQLAKLKYRPHNLKELRSEIGKIHSYSEEVTDVVTIHLHFDRAAGGTVFNEAGNIVPAFPRATYWLSRAQWINDYRN-----PMLYEASFFPENIEPVYEAAGLLRL
YtnP_Pseudomonas_citronellolis        --LGQFPDFPRAG---QFPRREAAVIDLASVTDVVTIEMMDHIFGGLLVDEKVNRLRPDVLRIHVAAATEVAFWAAQDFSLTSMPPAVPDVLRATAGQFMEAYRDKLHTF-----

QsdR1_Sinorhizobi_umfredii_NGR234      RFMAEYQSQRQF-----DEIYEVAPGVVTRIGHTPGHVVRLASGGDR-LTFAGDAVQVGFDPDWHNGFHDPEEAARVVRLLRELAATR--EPLVATHLPFVSVCHVAADGDVFRVWVWVDS
VAPYADRMKPFSG-----EAEVAAGFSAMFLPGHTPGHSGFMLDAGSEQ-LFWGDVHSTALQFRNPDWTFIFDADQSLAAQTRKAMFDRAVDQLLVTGMHLDFPGLGRVERDGGAYAFDQAPWQF
VAPYVAAGRFKTRFG-----EATLAPGIRAVMFGHTPGHTAYLIESGDAG--LAWGDIVHVAIQQLQDPDATVQYDSDADAARRTRRDLKRVANKRYLVGAHIAFPGLGHLRRDGEQYDWVFNDA
NTYKKNNEPIVDQVVT---FQQEIEITDEIKMAHGTGSDGSHAVIALESGET--MHLALDLP--HAHQVNLVWVMAYDDVPMTSIENKQKRMVYGAEKD--ANFTFVHDAVYRAVKWNEGHIVEKERTSI
VAPYQESGRFTAYDG---PFGINAGLSIVESPGHTPGHRSVLSYSSGQT--LITWGVVHNHVAQLPRFEITAEFVVEGSAQVATRQLLADAARERLMIGGHHFPFGLGHVPRDGTGVVWVVEYAF
FDAYGDRLRLFD---SGVLPGIDALFPGHTPGHTGYLLESRDQD--LITWGVVHHPHITQVREPVSIADFHDAFLAAATRSRLDSSSEGLLIAGHILGERGFARIERNNGYVWVVEYREE-
SSFFPENIEPVYEAAGLLRLIESRQLGSDATLKLKYHHTPGHIVLFDLDDGQ--IIFPAWVW--SAHLSGLWLSAYDNNAAALAMEEKKRFLDEAKVRN--ATLIFHDAYSRMEQVVP-
QFMEAYRDKLHTF-----EDEHEVAPGVVTRIGHTPGHVVHVTISAGER--LTFAGDAVQVGFDPDWHNGFHDPEESVVRVRLMQLGAAASG--ELLVATHLPFVSVGVAVDGDARFVIAAWFDY

```

**Slika 9.** Poravnanje sekvenci predstavlja odnos između *B. cepacia* BCC4135 laktonaza YtnP i Y2-aiiA analiziranih u ovoj studiji i drugih eksperimentalno potvrđenih AHL laktonaza. Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci izvršeno je korišćenjem Clustal W algoritma primenom *Neighbor-Joining* metode. U svrhu poravnanja sekvenci odabrani su predstavnici AHL laktonaza eksperimentalno validiranih i deponovanih u UniProt bazi podataka: QsdR1 - *Sinorhizobium fredii* NGR234 (NGR\_b16870); RmmL - *Ruegeria mobilis* YJ3 (MH289473); YtnP - *Bacillus subtilis* (CUB52828); YtnP - *Bordetella hinzii* (WP\_029577625); YtnP - *Petrimonas mucosa* (WP\_071136710.1); YtnP - *Pseudomonas citronellolis* (WP\_061561355). Uokvireni region predstavlja visoko konzervisanu aminokiselinsku sekvencu proteinske superfamilije metalo- $\beta$ -laktamaza HXHXDH dinuklerani cink-vezujući motiv sa aspartatom i histidinom u aktivnom mestu neophodnim za AHL degradujuću aktivnost.



**Slika 10.** Filogenetski profil različitih AHL laktonaza. Izvršeno je poređenje aminokiselinskih sekvenci potencijalnih QQ enzima soja *B. cepacia* BCC4135 sa funkcionalno okarakterisanim QQ enzimima poreklom iz različitih bakterijskih vrsta (A) kao i sa sekvencama pretpostavljenih QQ enzima bez dodeljene funkcije poreklom iz *Burkholderia* vrsta, navedenim sa



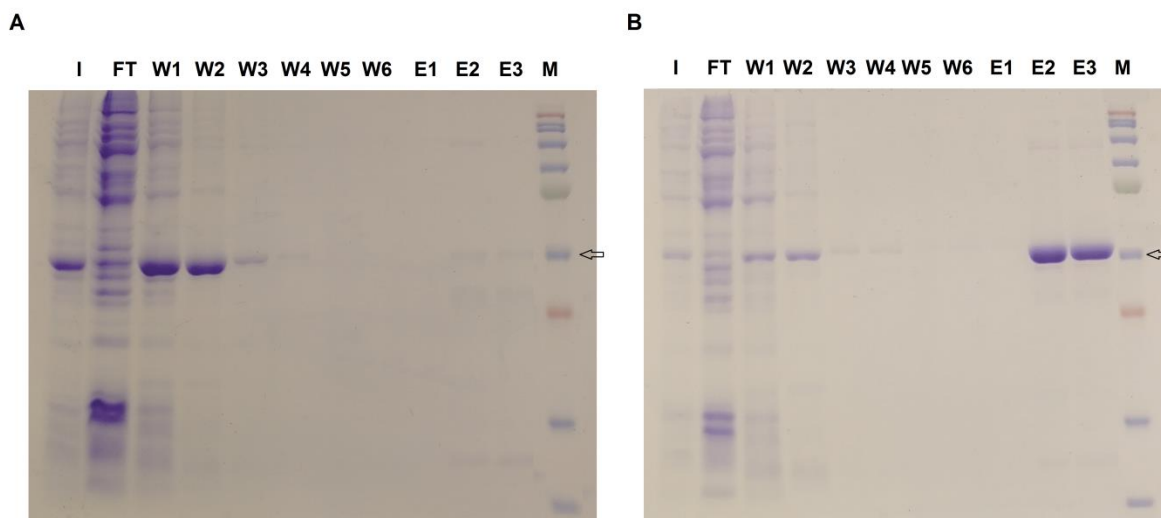
UniProt pristupnim brojevima (B). Filogenetska stabla konstruisana su *Neighbor-Joining* metodom, primenom MEGA softverskog paketa. Verodostojnost dobijenih stabala proveravana je podešavanjem standardnog parametra "bootstrap" na 1000 ponavljanja. Razmera predstavlja 0,5 supstitucija po aminokiselinskoj poziciji.

Predikcionom analizom upotrebom SignalP 5.0 programa Y2-*aiiA* identifikovan je kao ekstracelularni enzim na čijem N-terminusu se nalazi signalna sekvenca od 25 aminokiselina, dok signalni peptid nije detektovan u aminokiselinskoj sekvenci YtnP laktonaze.

#### 4.6. Kloniranje, ekspresija i prečišćavanje *B. cepacia* BCC4135 laktonaza

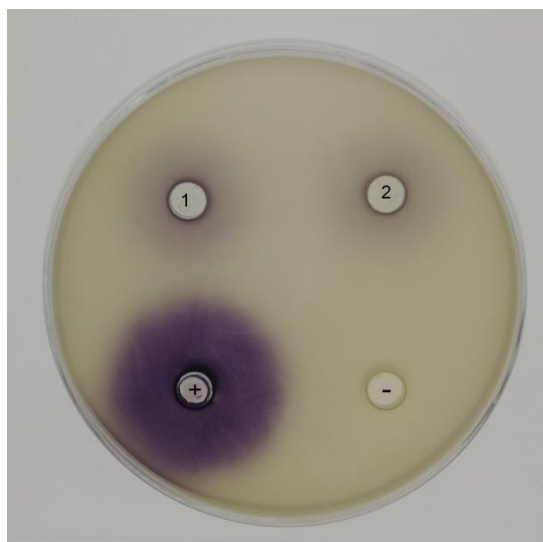
Kako bi se utvrdio samostalni doprinos *ytnP* i *y2-aiiA* gena u ispoljavanju QQ fenotipa, kao i provera funkcionalnosti proteina koje kodiraju i njihove detaljne karakterizacije, pristupili smo genetičkim manipulacijama kloniranja i ekspresije *B. cepacia* BCC4135 laktonaza u pQE30 sistemu za ekspresiju.

Forward prajmer *y2-aiiA* gena koji kodira ekstracelularnu laktonazu dizajniran je tako da njime nije obuhvaćena signalna sekvenca od 25 aminokiselina na N-terminusu. Dobijeni konstrukti za obe laktonaze u pQE30 vektoru za ekspresiju (pQE30Ytnp i pQE30Y2-*aiiA*) nakon indukcije sa IPTG formirali su inkluziona tela, čak i na sniženoj temperaturi od 23°C i koncentraciji IPTG od 0,1 mM, uz moguće formiranje disulfidnih mostova (na osnovu analize aminokiselinske sekvence).



**Slika 11.** SDS-PAGE analiza *B. cepacia* BCC4135 rekombinantnih laktonaza YtnP (A) i Y2-*aiiA* (B) tagovanih sa His<sub>6</sub> u svim fazama prečišćavanja u denaturišućim uslovima. I - indukovana kultura; FT - flow through; W1, W2, W3, W4, W5 i W6 - ispiranje kolone puferom u urea gradijentu (5 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M, 0 M, redom); E1, E2 i E3 - elucija proteina sa afinitetne kolone puferom za eluciju; M - proteinski marker (BlueEasy Prestained Protein Marker, Nippon Genetics). Strelicom je obeležena traka na proteinskom markeru koja odgovara veličini od 31 kDa.

U cilju prevazilaženja problema formiranja inkluzionih tela, prečišćavanje i renaturacija proteina izvršena je na Ni-NTA agaroznoj afinitetnoj hromatografiji u gradijentu uree 8 M - 0 M. Nakon elucije, izvršeno je odsoljavanje proteina dijalizom u 20 mM Tris-HCl puferu pH 7,4. SDS-PAGE analizom ustanovljeno je da prečišćeni enzimi YtnP i Y2-aiiA na osnovu pređenog puta u gelu imaju molekulske mase približno 31 kDa, što je u skladu sa njihovom predviđenom molekulskom masom od ~31,2 i ~33 kDa, redom (Slika 11).



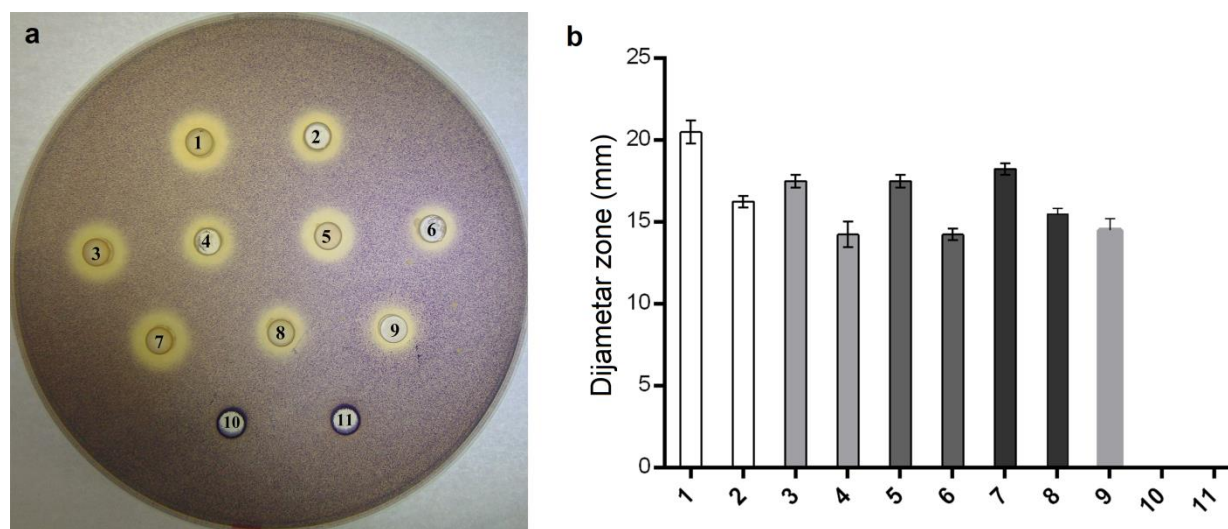
**Slika 12.** Aktivnost degradacije AHL molekula renaturisanih rekombinantnih laktonaza soja *B. cepacia* BCC4135 ispitana primenom testa difuzije u bunarićima upotrebom biosenzor soja *C. violaceum* CV026. Preostala aktivnost C6-HSL nakon tretmana YtnP (1) i Y2-aiiA (2) laktonazama. Pozitivna kontrola (+) predstavlja netretirani C6-HSL, a kao negativna kontrola (-) korišćen je 20 mM Tris-HCl pufer pH 7,4 sa 50% glicerola.

Primenom eseja difuzije u bunarićima ustanovljeno je da obe rekombinantne renaturisane laktonaze ispoljavaju QQ aktivnost degradujući C6-HSL (N-heksanoil-DL-homoserin lakton) (Slika 12).

## 4.7. Svojstva bioaktivnih molekula

### 4.7.1. Stabilnost *D. tsuruhatensis* 11304 molekula inhibitora *quorum sensing* sistema (QSI) i priprema QSI ekstrakta

Kako bi se utvrdilo da li je *D. tsuruhatensis* 11304 QQ aktivnost bazirana na proteinskoj ili neproteinskoj prirodi aktivnog/ih molekula, ispitani su njegova/njihova otpornost na delovanje proteinaze K kao i termostabilnost. Rezultati dobijeni primenom testa difuzije u bunarićima pokazali su da prekonocna kultura i supernatant zadržavaju *quorum sensing* inhibitornu (QSI) aktivnost nakon tretmana toplotom i proteinazom K (Slika 13). Termostabilnost je uočena nakon izlaganja 11304 soja temperaturi od 100°C nakon inkubacije u vremenskom intervalu od 30 i 60 min. Rezultati dobijeni nakon tretmana proteinazom K ukazuju da je QSI aktivnost *D. tsuruhatensis* 11304 soja bazirana na neenzimskom mehanizmu inaktivacije QS sistema.



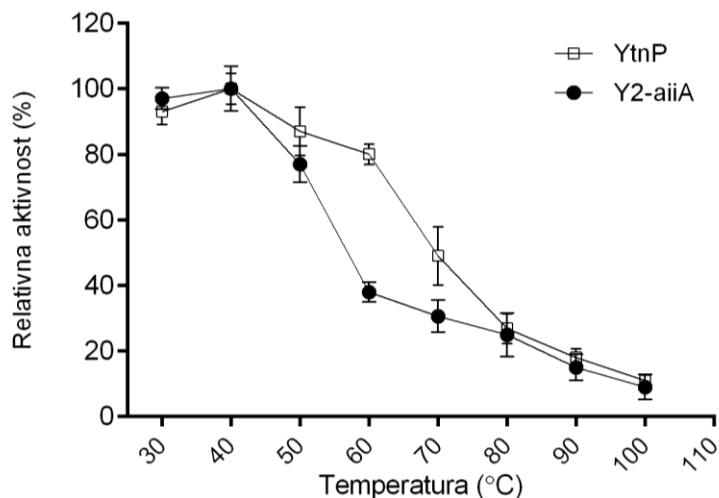
**Slika 13.** QSI aktivnost *D. tsuruhatensis* 11304 kliničkog izolata ustanovljena je primenom testa difuzije u bunarićima upotrebom *C. violaceum* CV026 biosenzor soja. (a) Aktivnost netretirane prekonocne kulture *D. tsuruhatensis* 11304 soja (1) i profiltiranog supernatanta (2). Nakon izlaganja temperaturi od 100°C u trajanju od 30 min (3, 4) i 60 min (5, 6) prekonocna kultura (3, 5) i supernatant (4, 6) zadržali su QSI aktivnost. Tretman proteinazom K nije uticao na QSI aktivnost *D. tsuruhatensis* 11304 prekonocne kulture (7) i supernatanta (8). Etil-acetatni ekstrakt soja *D. tsuruhatensis* 11304 pokazao je QSI aktivnost (9). Proteinaza K i LB medijum za kultivaciju koji je sadržao 0,5% DMSO (10, 11) korišćeni su kao negativne kontrole. (b) Kvantitativni podaci prethodnog eksperimenta dobijeni merenjem zona inhibicije produkcije pigmenta violaceina biosenzor soja *C. violaceum* CV026.

Organski rastvarači različite polarnosti korišćeni su kako bi se optimizovala ekstrakcija QSI molekula iz supernatanta prekonocne kulture *D. tsuruhatensis* 11304 soja gajenog u minimalnom M9 medijumu. Od korišćenih organskih rastvarača, jedino je etil-acetatni ekstrakt resuspendovan u DMSO pokazao QSI aktivnost, dok ekstrakcija korišćenjem metanola, hloroforma i heksana nije dala željene rezultate. Pripremljeni etil-acetatni ekstrakt (QSI ekstrakt) je potom korišćen u eksperimentima funkcionalne karakterizacije (odeljak 4.10.).



#### 4.7.2. Termostabilnost *B. cepacia* BCC4135 laktonaza

Termostabilnost, kao jedno od najpoželjnijih biotehnoških svojstava rekombinantnih proteina, ispitana je kod laktonaza soja BCC4135 u širokom temperaturnom opsegu sa ciljem utvrđivanja stepena njihove termorezistencije. Prečišćeni rekombinantni YtnP i Y2-aiiA enzimi zadržali su relativno visok nivo aktivnosti nakon 30 min tretmana na temperaturama u opsegu od 30 do 60°C za YtnP i od 30 do 50°C za Y2-aiiA laktonazu (Slika 14).



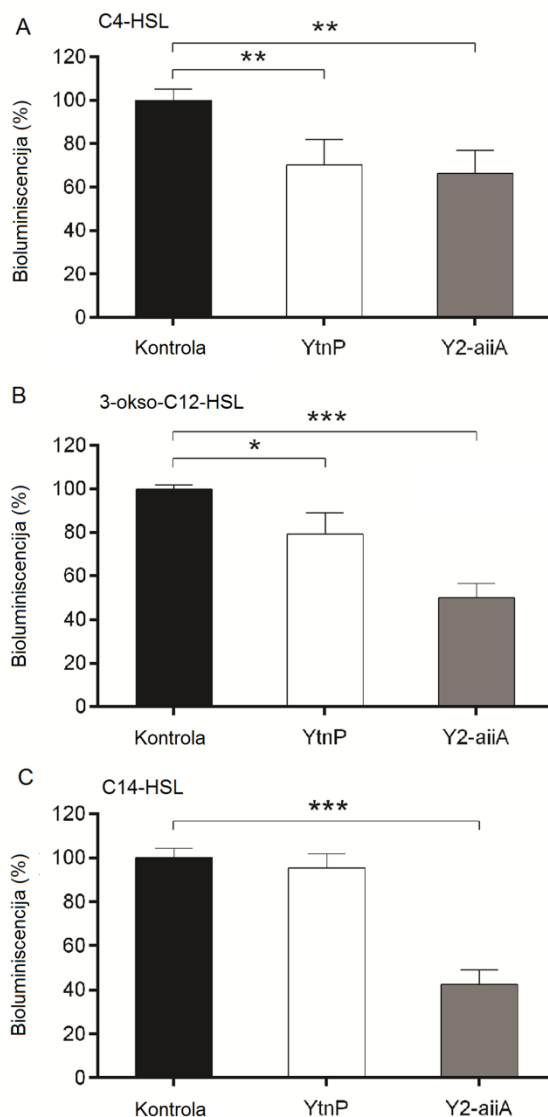
**Slika 14.** Termostabilnost *B. cepacia* BCC4135 QQ enzima. Grafički prikaz termostabilnosti YtnP i Y2-aiiA laktonaza inkubiranih na temperaturama u opsegu od 30 do 100°C (sa intervalima od 10°C). Preostali C6-HSL relativno je kvantifikovan upotrebom *C. violaceum* CV026 biosenzor soja testom difuzije u bunarićima. Aktivnost koju su YtnP i Y2-aiiA laktonaze zadržale nakon toplotnog tretmana izražena je kao recipročna vrednost preostalog C6-HSL.

Optimalna aktivnost dostignuta je na 40°C za obe BCC4135 laktonaze. Ustanovljeno je takođe da je sposobnost YtnP i Y2-aiiA enzima da degraduju AHL molekule kontinuirano opadala sa povećanjem temperature inkubacije. U slučaju YtnP, enzim je zadržao 50% aktivnosti nakon inkubacije na 70°C, dok je Y2-aiiA zadržao 40% svoje aktivnosti nakon izlaganja temperaturi od 60°C u trajanju od 30 min. Obe laktonaze ostvarile su 25% aktivnosti nakon inkubacije na 80°C i čak su pokazale, iako malu, ipak detektabilnu aktivnost nakon tretmana na 100°C.

#### 4.8. Esej bioluminiscencije

Sposobnost *B. cepacia* BCC4135 laktonaza da interferiraju sa *las* i *rhl* QS signalnim putevima *P. aeruginosa* degradacijom specifičnih AHL praćena je esejem bioluminiscencije.

AHL kratkih (N-butilil-DL-homoserin lakton, C4-HSL) i dugih acilnih lanaca (N-3-okso-dodekanoil-L-homoserin lakton, 3-okso-C12-HSL i N-tetradekanoil-DL-homoserin lakton, C14-HSL) korišćeni su kao supstrati u cilju praćenja aktivnosti *B. cepacia* BCC4135 laktonaza.



**Slika 15.** Analiza potencijala laktonaza soja *B. cepacia* BCC4135 da degraduju AHL molekule praćena esejem bioluminiscencije. Aktivnost YtnP i Y2-aiiA praćena je korišćenjem sledećih supstrata: C4-HSL (A), 3-okso-C12-HSL (B) i C14-HSL (C). Analiza je vršena upotrebom reporterskih sojeva *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-*rhlA* (za C4-HSL) i *P. aeruginosa* PA14-R3 (za 3-okso-C12-HSL i C14-HSL). Vrednosti bioluminiscencije normalizovane su u odnosu na gustinu ćelijske kulture. Statistička značajnost utvrđena je primenom Studentovog *t*-testa u odnosu na kontrolu bez tretmana rekombinantnim enzimima (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

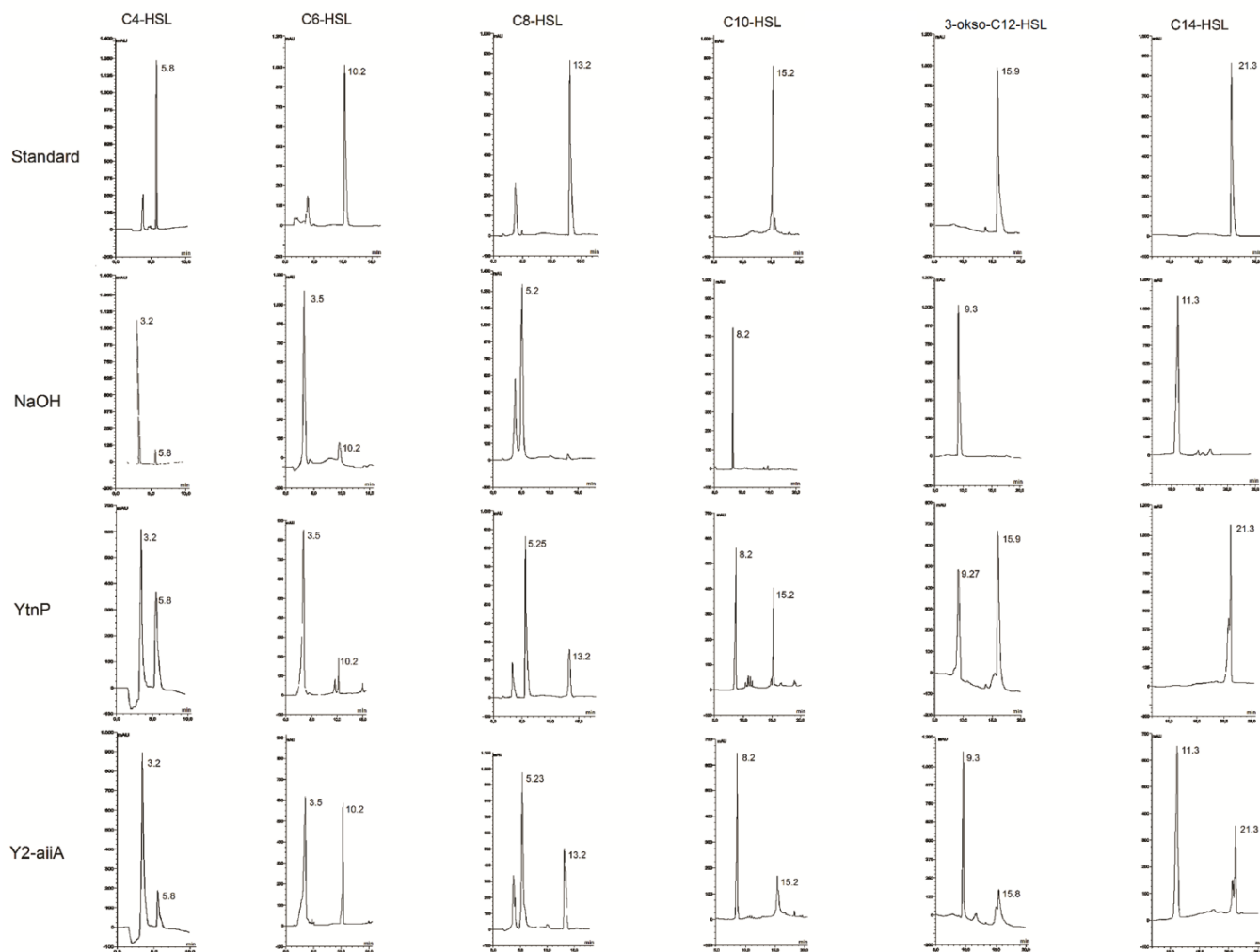
Dobijeni rezultati ukazuju na sposobnost oba rekombinantna enzima YtnP i Y2-aiiA da degraduju C4-HSL i time inhibiraju *rhl* QS signalni put za oko 30% (Slika 15A). Takođe, dok je YtnP pokazao sposobnost degradacije 3-okso-C12-HSL signalnog molekula za 20%, Y2-aiiA je imao veću supstratnu specifičnost za ovaj AHL, redukujući aktivnost *las* QS sistema za više od 50% (Slika 15B) i još veću uspešnost degradacije C14-HSL sa preko 60% aktivnosti (Slika 15C) u datim uslovima. YtnP enzim nije pokazao statistički značajnu sposobnost degradacije C14-HSL korišćenjem *P. aeruginosa* PA14-R3 kao biosenzor soja.

#### 4.9. Laktonaze soja *B. cepacia* BCC4135 poseduju široku supstratnu specifičnost

U cilju određivanja supstratne specifičnosti *B. cepacia* BCC4135 laktonaza, korišćeni su AHL molekuli različite dužine bočnih acilnih lanaca (od 4 do 14 C atoma). Reakcija hidrolize vršena je na 37°C, optimalnoj temperaturi za kultivaciju soja BCC4135. Netretirani AHL inkubirani su pod istim uslovima i potom primenjeni kao standardi u HPLC analizi. HPLC analizom potvrđeni su prethodno dobijeni rezultati eseja bioluminiscencije.

Oba rekombinantna enzima pokazala su sposobnost degradacije C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL (N-oktanoil-DL-homoserin lakton) i C10-HSL (N-dekanoil-DL-homoserin lakton) (Slika 16). Frakcionom analizom AHL standarda detektovani su pikovi sa sledećim retencionim vremenima 5,8; 10,2; 13,2; 15,2; 15,9 i 21,3 min za C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, 3-okso-C12-HSL, i C14-HSL, redom. Produkti enzimske degradacije sadrže pikove analiziranih AHL sa sledećim retencionim vremenima 3,2; 3,5; 5,2; 8,2; 9,3 i 11,3 min, od C4 do C14-HSL, redom. Slična retencionna vremena detektovana su za sve AHL produkte dobijene baznom hidrolizom sa 1 M NaOH.

Glavna razlika u supstratnoj specifičnosti uočena je kod dugih acilnih lanaca AHL (3-okso-C12-HSL i C14-HSL), posebno u slučaju C14-HSL gde je Y2-aiiA rekombinantni enzim pokazao delimičnu sposobnost degradacije, dok YtnP nije imao tu sposobnost, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u eseju bioluminiscencije.



**Slika 16.** HPLC analiza AHL degradacije laktonazama soja *B. cepacia* BCC4135 i njihova supstratna specifičnost. AHL standardi, AHL tretirani sa 1 M NaOH, YtnP i Y2-aiiA, inkubirani su pod istim uslovima i potom podvrgnuti HPLC analizi. Glavni pikovi AHL standarda kao i produkata bazne i enzimске degradacije predstavljeni su na slici.

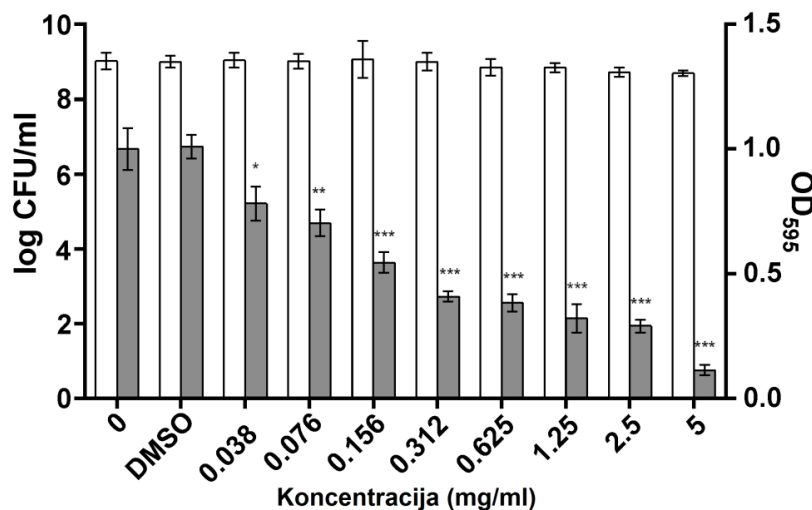
#### 4.10. Funkcionalna karakterizacija bioaktivnih molekula na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83

Funkcionalna karakterizacija bioaktivnih molekula poreklom iz kliničkih izolata *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 urađena je sa ciljem analize njihovog antivirulentnog potencijala kroz utišavanje međucelijske komunikacije bakterija na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83.

##### 4.10.1. *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt ostvaruje anti-biofilm efekat - kristal violet bojenje

Kako bismo isključili antibakterijski efekat *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na *P. aeruginosa* MMA83, ispitana je njegova antimikrobna aktivnost mikrodilucionom metodom. Iz dobijenih rezultata prikazanih na Slici 17 uočljivo je da QSI ekstrakt ne ostvaruje statistički značajan efekat na rast kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83.

Dobijeni rezultati kristal violet bojenjem takođe su pokazali uticaj QSI ekstrakta na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83 na dozno-zavisen način (Slika 17).



**Slika 17.** Uticaj *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83 kvantitativno je utvrđeno kristal violet bojenjem. *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt utiče na formiranje biofilma na dozno -zavisen način. Rast *P. aeruginosa* MMA83 predstavljen je belim (log CFU/ml), a formiranje biofilma sivim stubićima (OD<sub>595</sub>). Brojevi na x-osi predstavljaju seriju dvostrukih razblaženja QSI ekstrakta izraženih u jedinicama mg/ml. DMSO - bakterijska kultura gajena sa 0,5% v/v DMSO što je ujedno i najveća koncentracija DMSO primenjena u eksperimentu (korišćena prilikom tretmana sa 5mg/ml QSI ekstrakta). Analiza dobijenih podataka Studentovim *t*- testom ukazuje na statističku značajnost ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ) između tretiranih kultura i netretirane kontrole (kontrole kultivisane u prisustvu DMSO). Nije uočena statistička značajnost u rastu bakterijske kulture MMA83 između tretirane i netretirane kontrole.

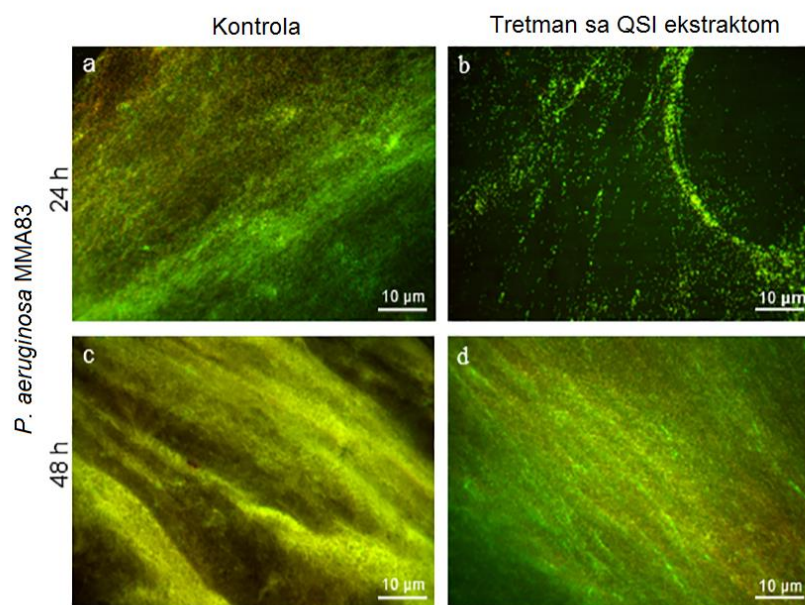
Formiranje biofilma smanjeno je za 88,5% u prisustvu 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta u odnosu na netretiranu kontrolu ( $***p < 0,001$ ). Oko 50% inhibicije formiranja biofilma uočeno je prilikom tretmana sa 0,156 mg/ml QSI ekstrakta ( $***p < 0,001$ ). Najniža testirana

koncentracija QSI ekstrakta (0,038 mg/ml) dovela je do smanjenja formiranja biofilma za 21,9% u odnosu na netretiranu kontrolu (\* $p < 0,05$ ). Tretman *P. aeruginosa* MMA83 sa najvećom koncentracijom DMSO u eksperimentu (0,5% v/v) nije ispoljio statistički značajan uticaj na rast bakterijske kulture i formiranje biofilma.

#### 4.10.2. Fluorescentna mikroskopija

##### 4.10.2.1. *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt sprečava formiranje, ali ne i dekompoziciju formiranog biofilma

Fluorescentna mikroskopija primenjena je kako bi se vizuelizovao uticaj *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na formiranje biofilma kao i na dekompoziciju formiranog biofilma *P. aeruginosa* MMA83.



**Slika 18.** Vizuelizacija biofilma fluorescentnom mikroskopijom. Uticaj *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na formiranje (b) i dekompoziciju formiranog biofilma (d). *P. aeruginosa* MMA83 test soj inkubiran je 24 h sa 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta u cilju vizuelizacije njegovog efekta na formiranje biofilma (b). Uticaj QSI ekstrakta na dekompoziciju 24 h starog formiranog biofilma praćen je nakon 24 h tretmana QSI ekstraktom (d). Fluorescentne mikrofografije netretiranih biofilmova *P. aeruginosa* MMA83 starih 24 h (a) i 48 h (c) (uz dodatak DMSO 0,5% v/v) na pokrovnim staklima. Za bojenje biofilma korišćene su fluorescentne boje SYTO9 (zelena) i PI (crvena). Razmera predstavlja vrednost od 10 µm.

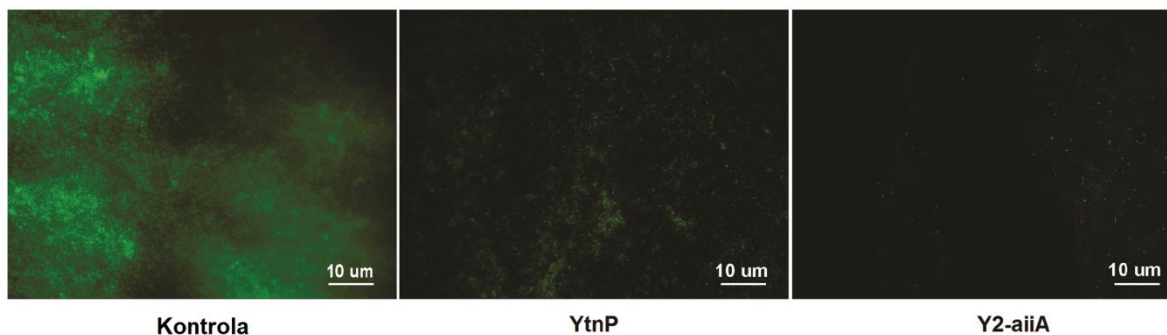
Dobijene mikrofografije ukazuju da *P. aeruginosa* MMA83 formira kompaktan biofilm na mikroskopskom staklu u odsustvu *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta (Slika 18a). U prisustvu QSI ekstrakta uočljiv je veoma disperzan biofilm, sa jasnim smanjenjem pokrivenosti površine pokrovnog stakla i brojem bakterijskih ćelija. Kao što je predstavljeno na Slici 18b, minimalno vezivanje *P. aeruginosa* MMA83 ćelija za površinu može se detektovati u slučaju tretmana sa 5 mg/ml QSI ekstrakta, nakon 24 h inkubacije.

Interesantno je, međutim, navesti da tretman prethodno formiranog biofilma *P. aeruginosa* MMA83 QSI ekstraktom (5 mg/ml) nije ostvario uticaj na dekompoziciju biofilma (Slika 18d), iako je arhitektura biofilma bila manje konzistentna i nešto drugačija u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 18c), i dalje su vidljive bakterijske ćelije koje podsećaju na arhitekturu biofilma uočenu kod netretirane kontrole.

#### 4.10.2.2. *B. cepacia* BCC4135 laktonaze inhibiraju formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83

Rezultati dobijeni fluorescentnom mikroskopijom ukazuju da obe rekombinantne laktonaze YtnP i Y2-aiiA ostvaruju negativan uticaj na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83.

U prisustvu YtnP i Y2-aiiA (10 µg/ml, finalna koncentracija), formiranje biofilma je u znatnoj meri sprečeno, sa jasnim smanjenjem konfluentnosti sloja biofilma i gustine bakterija na površini pokrovnog stakla.



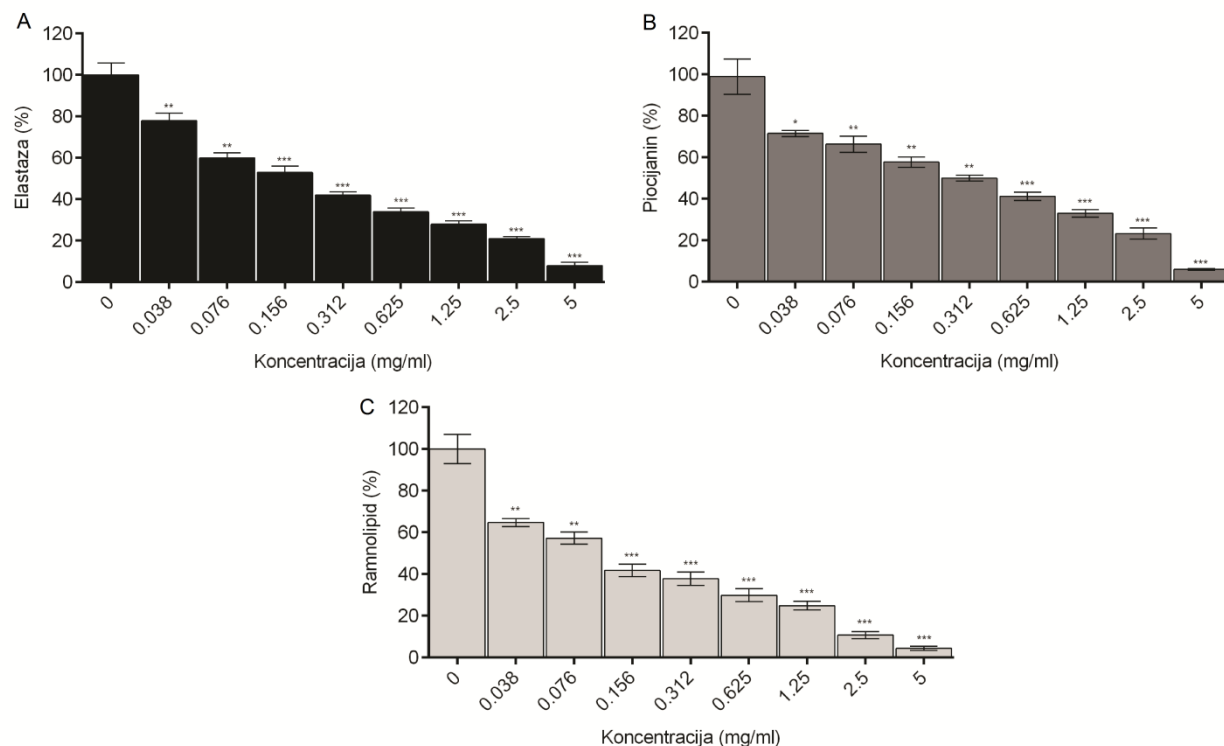
**Slika 19.** Ispitivanje uticaja *B. cepacia* BCC4135 laktonaza na formiranje biofilma kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 - fluorescentna mikroskopija. Dobijene mikrografije ukazuju na efekat YtnP i Y2-aiiA rekombinantnih enzima na sposobnost formiranja biofilma *P. aeruginosa* MMA83. Fluorescentna boja SYTO9 korišćena je za vizuelizaciju biofilmova. Razmera predstavlja vrednost od 10 µm.

Nakon tretmana u trajanju od 24 h, dobijenim mikrografijama ustanovljeno je da su agregati biofilma *P. aeruginosa* MMA83 znatno više disperzni u slučaju ekstracelularne laktonaze Y2-aiiA, pokazujući znatno veći anti-biofilm efekat u poređenju sa intracelularnom laktonazom YtnP (Slika 19). Može se uočiti takođe da test soj *P. aeruginosa* MMA83 formira kompaktan biofilm u odsustvu *B. cepacia* BCC4135 laktonaza (kontrola; Slika 19).

### 4.10.3. Uticaj bioaktivnih molekula na produkciju ekstracelularnih faktora virulencije

#### 4.10.3.1. *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt inhibira produkciju ekstracelularnih faktora virulencije *P. aeruginosa* MMA83

Uticaj *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na QS-regulisanu produkciju ekstracelularnih faktora virulencije - elastaze, piocijanina i ramnolipida *P. aeruginosa* MMA83 ispitan je primenom odgovarajućih funkcionalnih eseja.



**Slika 20.** Grafički prikaz dozno-zavisnog uticaja *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na produkciju ekstracelularnih faktora virulencije test soja *P. aeruginosa* MMA83. Crni stubići predstavljaju produkciju elastaza (A), tamnosivi - piocijanina (B), dok svetlosivi predstavljaju produkciju ramnolipida (C). Statistička značajnost izražena je Studentovim *t*-testom u odnosu na kontrolu (0) koja nije tretirana QSI ekstraktom (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

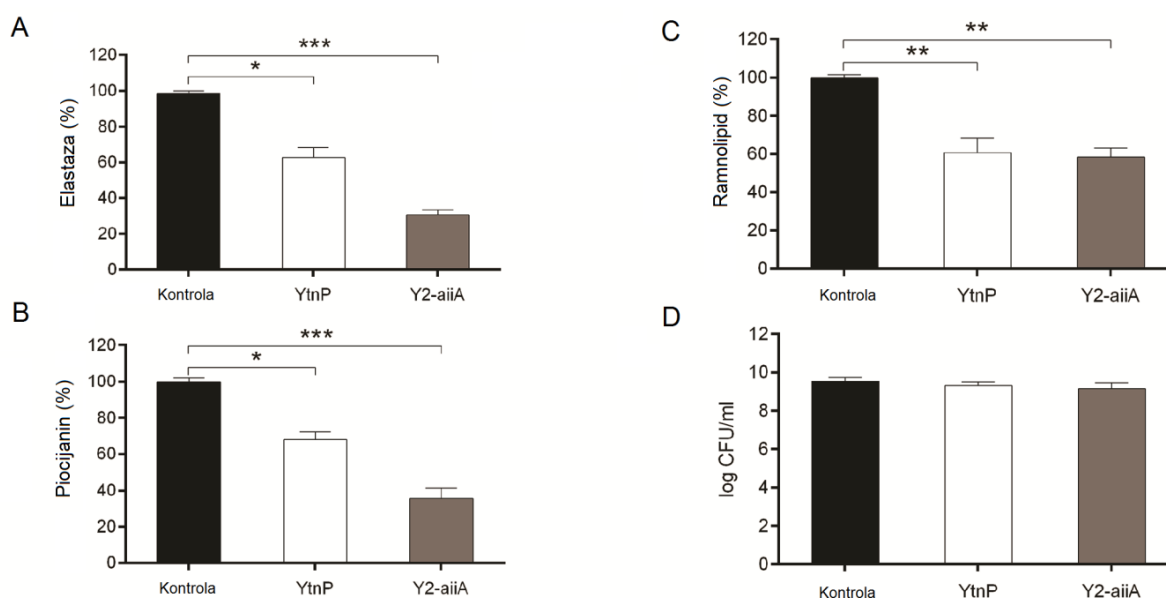
Dobijeni rezultati ukazuju na dozno-zavisan efekat QSI ekstrakta na smanjenje produkcije svih analiziranih faktora virulencije (Slika 20). Tretman *P. aeruginosa* MMA83 soja sa 5 mg/ml QSI ekstrakta doveo je do gotovo potpunog izostanka produkcije elastaza, piocijanina i ramnolipida. Tretman sa 0,156 mg/ml QSI ekstrakta rezultirao je u inhibiciji produkcije ramnolipida za oko 40%, dok je produkcija elastaza i piocijanina smanjena za oko 50% u odnosu na netretiranu kontrolu. Najniža primenjena koncentracija QSI ekstrakta (0,038 mg/ml) dovela je do smanjenja produkcije elastaza za 22%, piocijanina za 28,5% dok je efikasnost u smanjenju produkcije ramnolipida bila najizraženija i iznosila je 35% u poređenju sa netretiranom kontrolom.



#### 4.10.3.2. *B. cepacia* BCC4135 laktonaze inhibiraju produkciju ekstracelularnih faktora virulencije *P. aeruginosa* MMA83

U *in vitro* uslovima ispitan je takođe efekat YtnP i Y2-aiiA rekombinantnih laktonaza na produkciju faktora virulencije elastaza, piocijanina i ramnolipida kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83.

Ustanovljeno je da nakon tretmana testiranog soja YtnP i Y2-aiiA rekombinantnim enzimima (10 µg/ml, finalna koncentracija) dolazi do smanjenja elastazne aktivnosti za 37% odnosno 70%, redom (Slika 21A). Slični rezultati dobijeni su i nakon praćenja uticaja *B. cepacia* BCC4135 laktonaza na produkciju piocijanina (Slika 21B). Konačno, tretman sa YtnP i Y2-aiiA laktonazama doveo je do smanjenja produkcije ramnolipida za oko 40% u slučaju oba enzima u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 21C).



**Slika 21.** Ispitivanje antivirulentnog potencijala *B. cepacia* BCC4135 laktonaza korišćenjem *P. aeruginosa* MMA83 kliničkog izolata kao model sistema. Efekat *B. cepacia* BCC4135 laktonaza na produkciju elastaza (A), piocijanina (B) i ramnolipida (D) ustanovljen je primenom odgovarajućih funkcionalnih eseja. Statistička značajnost dobijenih rezultata utvrđena je primenom Studentovog *t*-testa u odnosu na netretiranu kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Bakterijski rast izražen je kao CFU/ml (D). Nije uočena značajna razlika u rastu bakterijske kulture tretirane sa *B. cepacia* BCC4135 laktonazama u odnosu na netretiranu kontrolu.

Paralelno je praćen uticaj *B. cepacia* BCC4135 laktonaza na rast ćelija *P. aeruginosa* MMA83 u planktonu, pri čemu je konstatovano da YtnP i Y2-aiiA enzimi nisu ostvarili negativan uticaj na rast bakterijske kulture (Slika 21D).

#### 4.10.4. *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt ostvaruje sinergistički efekat sa antibioticima

U cilju ispitivanja kliničkog značaja 11304 QSI ekstrakta i njegove efikasnosti u kombinaciji sa klinički relevantnim antibioticima, primenjen je metod šahovske table.

Dobijeni rezultati ukazuju da je test soj *P. aeruginosa* MMA83 osetljiv na odabrane antibiotike meropenem i gentamicin tek na veoma visokim koncentracijama (MIK vrednost za meropenem bila je 0,512 mg/ml i 4,096 mg/ml za gentamicin). MIK vrednost *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta iznosila je 20 mg/ml. Međutim, kombinovana primena antibiotika sa QSI ekstraktom pokazala je sinergističko delovanje i za meropenem ( $\Sigma$ FIK = 0,125) i za gentamicin ( $\Sigma$ FIK = 0,047). Ispitivanjem uticaja DMSO (MIK vrednost 145,45 mg/ml) u kome je rastvoren 11304 QSI ekstrakt ustanovljeno je njegovo indiferentno delovanje u slučaju kombinacije sa oba primenjena antibiotika.

MIK vrednosti svake analizirane antimikrobne supstance pojedinačno i u kombinaciji, kao i frakciona inhibitorna koncentracija i njihovo konačno delovanje na rast *P. aeruginosa* MMA83 prikazani su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Metod šahovske table predstavlja efekat primenjenih antimikrobnih supstanci na rast kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMA83					
Antimikrobne supstance	MIK svake antimikrobne supstance (mg/ml)		FIK	$\Sigma$ FIK	Konačno delovanje
	Pojedinačno	U kombinaciji			
QSI ekstrakt	20	1,25	0,0625	0,125	Sinergističko
Meropenem	0,512	0,032	0,0625		
DMSO	145,45	145,45	1	3	Indiferentno
Meropenem	0,512	1,024	2		
QSI ekstrakt	20	0,625	0,03125	0,047	Sinergističko
Gentamicin	4,096	0,064	0,0156		
DMSO	145,45	145,45	1	2	Indiferentno
Gentamicin	4,096	4,096	1		

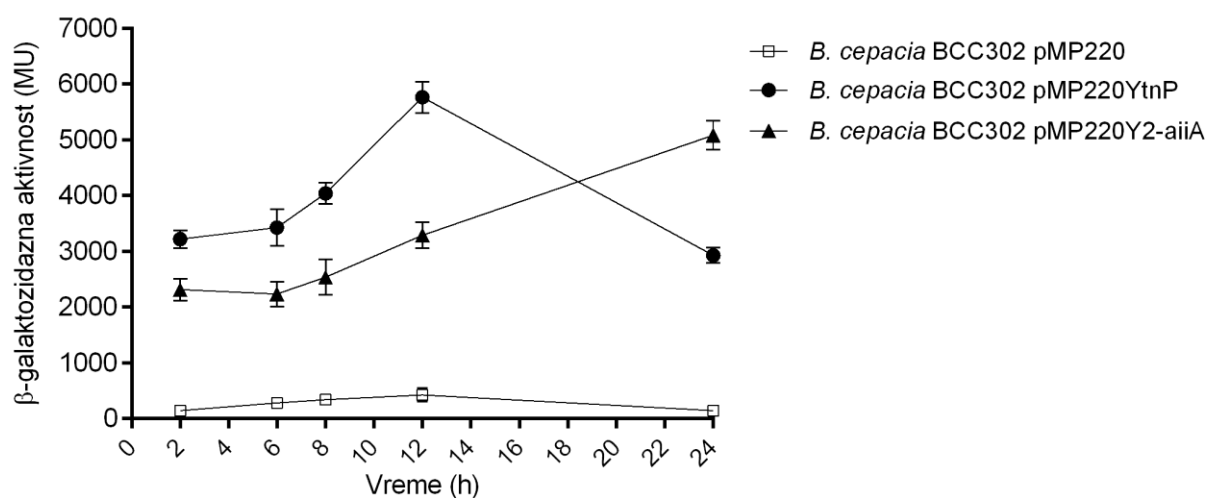
FIK - frakciona inhibitorna koncentracija, FIK = MIK u kombinaciji / MIK pojedinačna vrednost

$\Sigma$ FIK - zbirna vrednost dve FIK vrednosti,  $\Sigma$ FIK = FIK antibiotika + FIK QSI ekstrakta ili DMSO.

#### 4.11. Zavisnost promotorske aktivnosti gena koji kodiraju *B. cepacia* BCC4135 laktonaze od faze rasta bakterijske kulture

S obzirom da su rezultati prethodno primenjenih fenotipskih eseja pokazali zavisnost QQ aktivnosti *B. cepacia* BCC4135 soja od faze rasta, ideja ovog istraživanja bila je da se takođe ispita dinamika aktivnosti promotora gena koji kodiraju BCC4135 laktonaze.

Primenom  $\beta$ -galaktozidaznog eseja ustanovljeno je da *ytnP* promotorska fuzija pokazuje kontinuirano povećanje aktivnosti do dostizanja stacionarne faze rasta, a potom dolazi do brzog opadanja aktivnosti (najveća aktivnost detektovana je u 12 h sa naglim padom nakon 24 h kultivacije) (Slika 22). Nasuprot tome,  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost *y2-aiiA* promotorske fuzije pokazala je postepeno povećanje tokom faza rasta bakterijske kulture, sa najvećom aktivnošću zabeleženoj u kasnoj stacionarnoj fazi (24 h). Ustanovljeno je, takođe, da je aktivnost *ytnP* promotora 1,5 puta veća u odnosu na *y2-aiiA* promotorsku aktivnost u toku lag, log i stacionarne faze rasta, dok je nakon 24 h (kasna stacionarna faza) vrednost bila obrnuta, uz ustanovljenu veću aktivnost *y2-aiiA* promotorske fuzije.



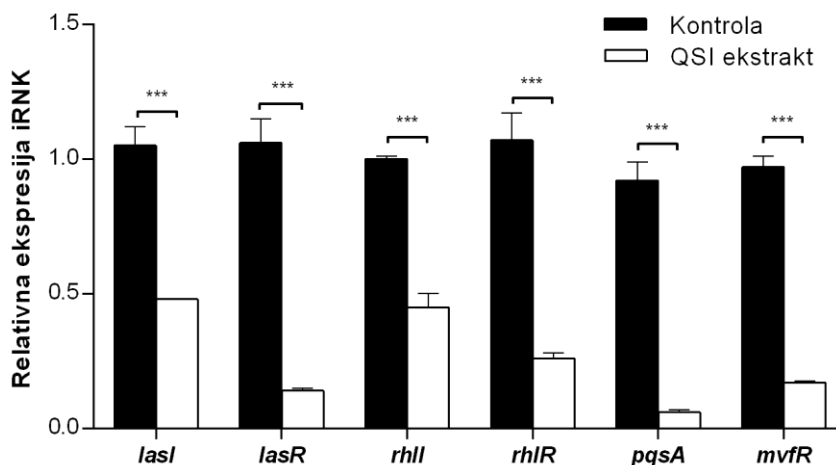
**Slika 22.**  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost promotora gena koji kodiraju *B. cepacia* BCC4135 laktonaze praćena kroz različite faze rasta bakterijske kulture. *B. cepacia* BCC302 soj transformisan vektorom za kloniranje promotorskih sekvenci pMP220 korišćen je kao negativna kontrola.  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost izražena je u Milerovim jedinicama (eng. *Miller units*, MU).

## 4.12. Transkripciona analiza

### 4.12.1. *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt inhibira ekspresiju gena uključenih u *P. aeruginosa* MMA83 QS sistem

Kako bismo potvrdili prethodno dobijene rezultate o uticaju *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na virulenciju *P. aeruginosa* MMA83 na transkripcionom nivou, za RT-qPCR analizu odabrani su geni pripadnici tri QS mreže *P. aeruginosa* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *mvfR*).

Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu ukazuju da tretman *P. aeruginosa* MMA83 sa 5 mg/ml QSI ekstrakta značajno smanjuje nivo iRNK svih analiziranih gena ( $***p < 0,001$ ) (Slika 23). Relativna ekspresija gena koji kodiraju autoinducer sintaze *lasI* i *rhlI* bila je smanjena 2,2 puta, dok je ekspresija transkripcionih regulatora *lasR* i *rhlR* bila smanjena znatno više (7,6 i 4,1 puta, redom) u poređenju sa netretiranom kontrolom. Najznačajnije smanjenje nivoa transkripcije zabeleženo je u slučaju *pqsA* gena (15 puta smanjeno), dok je relativna ekspresija transkripcionog regulatora *mvfR* bila 5,7 puta manja u odnosu na netretiranu kontrolu.

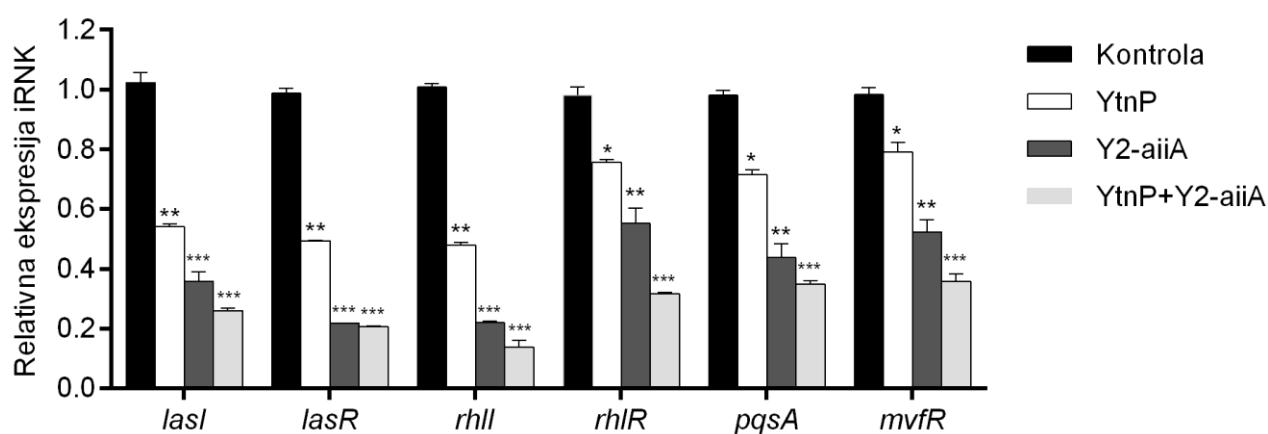


**Slika 23.** Promene relativnog nivoa ekspresije iRNK QS gena test soja *P. aeruginosa* MMA83 netretiranog i tretiranog sa 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta. Geni ispitivani u okviru ove studije pripadaju trima QS mrežama vrste *P. aeruginosa* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *mvfR*). Vrednosti dobijene RT-qPCR analizom normalizovane su u odnosu na *rpsL* gen koji kodira protein ribozoma koji je korišćen kao endogena kontrola. Studentov *t*-test je primenjen kako bi se izvršilo poređenje razlika između kontrolnih i eksperimentalnih grupa ( $***p < 0,001$ ).

#### 4.12.2. *B. cepacia* BCC4135 laktonaze smanjuju nivo ekspresije gena uključenih u *P. aeruginosa* MMA83 QS sistem

Uticaj YtnP i Y2-aiiA rekombinantnih enzima na *P. aeruginosa* QS sistem na transkripcionom nivou ispitan je u cilju potvrde prethodno opisanih efekata BCC4135 laktonaza na formiranje biofilma i produkciju ekstracelularnih faktora virulencije *P. aeruginosa* MMA83. Kao i u slučaju ispitivanja uticaja QSI ekstrakta, i u ovom eksperimentu je ispitano delovanje BCC4135 laktonaza na odabrane gene koji pripadaju trima *P. aeruginosa* QS mrežama - *las*, *rhl*, i *pqs* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *mvfR*).

Dobijeni rezultati pokazali su da tretman *P. aeruginosa* MMA83 sa YtnP i Y2-aiiA enzimima (10 µg/ml, finalna koncentracija) značajno smanjuje nivo ekspresije iRNK analiziranih *P. aeruginosa* QS gena (Slika 24). Najistaknutije promene na transkripcionom nivou uočene su u slučaju *lasR* i *rhlI* za obe testirane laktonaze. Nivo ekspresije bio je manji za 2 i 2,1 puta nakon tretmana sa YtnP i 5 i 4,5 puta manji u slučaju Y2-aiiA enzima, redom. Relativna ekspresija *lasI* gena koji kodira autoinducer sintazu bila je 1,9 odnosno 2,9 puta manja nakon tretmana sa YtnP i Y2-aiiA, dok je ekspresija *rhlR* gena za transkripcioni regulator bila nešto manje redukovana (1,3 i 1,8 puta, redom) u poređenju sa netretiranom kontrolom.



**Slika 24.** RT-qPCR analiza primenjena je za ispitivanje uticaja *B. cepacia* BCC4135 laktonaza na transkripciju gena uključenih u QS sistem *P. aeruginosa*. Promene relativnog nivoa ekspresije iRNK *P. aeruginosa* MMA83 QS gena nakon inkubacije sa YtnP i Y2-aiiA enzimima, pojedinačno i u kombinaciji. Geni ispitivani u ovom istraživanju deo su tri *P. aeruginosa* QS mreže *las*, *rhl* i *pqs* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *mvfR*). RT-qPCR vrednosti normalizovane su u odnosu na *rpsL* gen koji kodira protein ribozoma koji je korišćen kao endogena kontrola. Studentov *t*-test primenjen je kako bi se izvršilo poređenje razlika između kontrolnih i eksperimentalnih grupa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

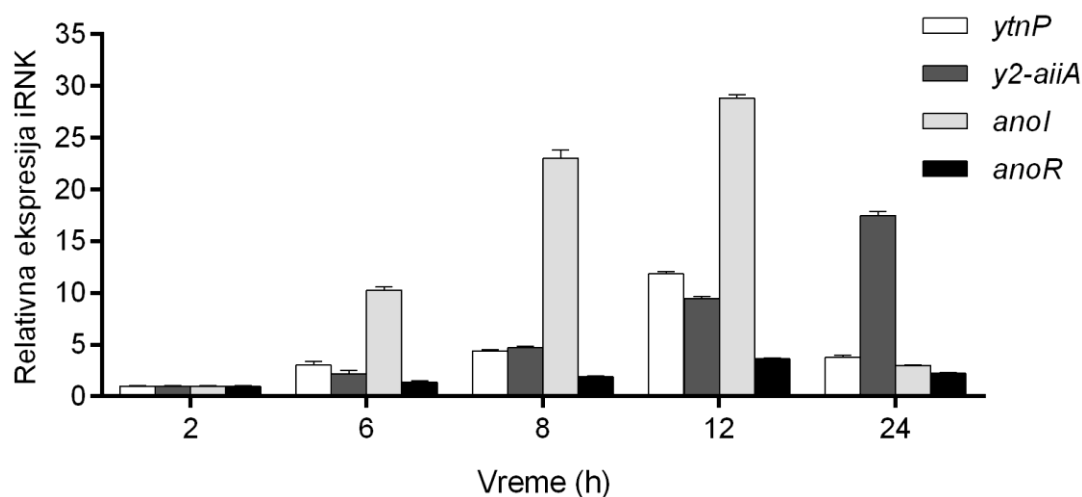
Pored toga, *pqs* mreža (*pqsA* i *mvfR* geni) bila je takođe negativno regulisana nakon tretmana BCC4135 laktonazama. Relativni nivo ekspresije *pqsA* i *mvfR* bio je smanjen 1,4 i 1,2 puta u slučaju tretmana sa YtnP i 2,2 odnosno 1,9 puta nakon inkubacije sa Y2-aiiA laktonazom. Y2-aiiA laktonaza pokazala se kao efikasnija u smanjenju nivoa ekspresije svih analiziranih gena uključenih u QS sistem

*P. aeruginosa* MMA83. Takođe, primećen je izraženiji efekat na smanjenje transkripcije *P. aeruginosa* QS gena kada su oba rekombinantna enzima YtnP i Y2-*aiiA* primenjena zajedno (Slika 24).

#### 4.12.3. Vremenska zavisnost ekspresije gena uključenih u QS i QQ mrežu soja *B. cepacia* BCC4135

Nivo ekspresije *B. cepacia* BCC4135 gena koji kodiraju QQ laktonaze kao i QS gene koji kodiraju AHL sintazu (gen *anoI*) i transkripcioni aktivator (gen *anoR*) praćeni su tokom različitih faza rasta bakterijske kulture, u odgovarajućim vremenskim tačkama odabranim u skladu sa CFU vrednostima za date vremenske intervale.

Promene relativnog nivoa ekspresije iRNK *B. cepacia* gena ispitanih primenom RT-qPCR predstavljene su na Slici 25. Na osnovu dobijenih rezultata, pokazano je da je nivo iRNK analiziranih QS i QQ gena varirao tokom različitih faza rasta. Svaki od analiziranih gena pokazao je trend povećanja nivoa iRNK tokom tranzicije iz logaritamske u stacionarnu fazu rasta bakterijske kulture. Nakon dostizanja najvećeg nivoa ekspresije u 12-om satu, nivo iRNK intracelularne laktonaze *ytnP* kao i *anoI* i *anoR* smanjen je gotovo do početnih vrednosti nakon 24 h. Međutim, vrednosti *y2-aiiA* iRNK pokazale su konstantno povećanje, sa najvećim nivoom dostignutim u 24-om h, što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim analizom aktivnosti promotorskih fuzija primenom  $\beta$ -galaktozidaznog eseja (Slika 22).

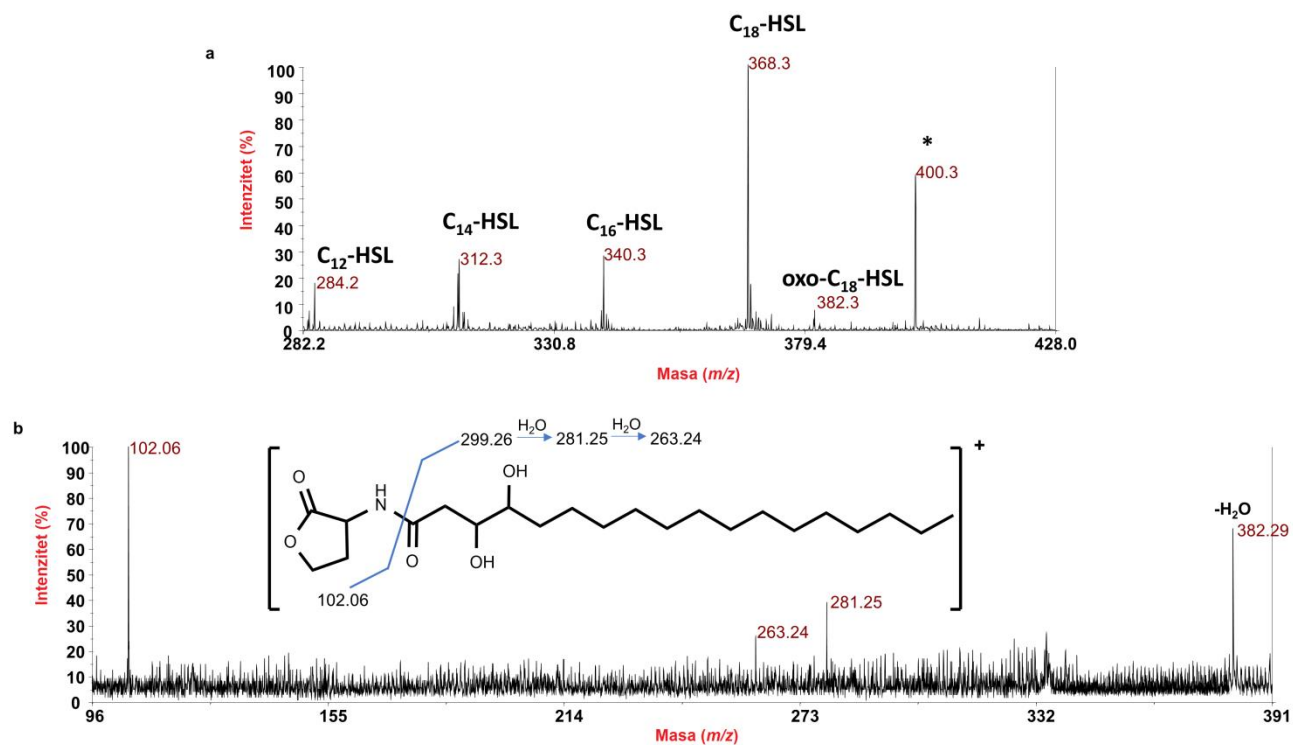


**Slika 25.** Zavisnost nivoa ekspresije QS i QQ gena *B. cepacia* BCC4135 analiziranih RT-qPCR-om. Praćen je nivo iRNK BCC4135 gena koji kodiraju QQ laktonaze kao i QS gena koji kodiraju AHL sintazu (*anoI*) i transkripcioni aktivator (*anoR*). Dobijeni rezultati normalizovani su u odnosu na *lepA* gen koji kodira elongacioni faktor 4 translacije korišćenog kao endogena kontrola.

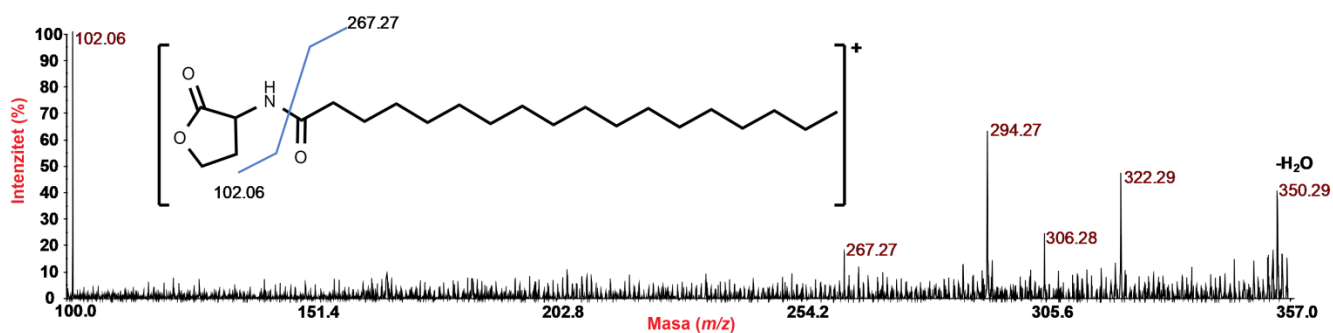
#### 4.13. Utvrđivanje sastava *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta primenom MALDI u kombinaciji sa masenom spektrometrijom

U cilju definisanja prirode molekula koji se nalaze u sastavu *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta, alikvot uzorka je prvobitno prečišćen na TLC silikatnom gelu. Razdvojene komponente su vizuelizovane, a potom izdvojene sa površine TLC ploče. Uzorci sa silikatnog gela eluirani su etil-acetatom, osušeni i potom analizirani primenom MALDI instrumentalne metode u kombinaciji sa masenom spektrometrijom. Nekoliko organskih rastvarača upotrebljeno je kako bi se rastvorio i analizirao QSI ekstrakt, međutim, najbolji spektri dobijeni su rastvaranjem QSI ekstrakta direktno u rastvaraču matriksa -  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetnoj kiselini.

MALDI MS spektar snimljen u pozitivnom refleksionom modu prikazan je na Slici 26. Dobijeni spektar jasno ukazuje na prisustvo nekoliko  $[M+H]^+$  jona koji se mogu pripisati AHL molekulima sa dužinom bočnih acilnih lanaca od C12 do C18 atoma. Najizraženiji pik sa molekulskom masom od  $m/z$  368,3 identifikovan je kao N-oktadekanoil homoserin lakton (C18-HSL). Ovi nalazi su takođe podržani analizom odgovarajućeg pozitivnog jona u  $MS^2$  spektru (Slika 27), te dobijeni rezultati ukazuju na (i) prisustvo tipičnog intenzivnog pika na  $m/z$  102,06, zajedničkog za sve detektovane AHL, čija molekulska masa odgovara protonovanom  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolaktonu koji potiče od cepanja karboksiamidne veze između acilnog lanca i homoserin grupe; (ii) prisustvo analognog acilijum jona koji nastaje istim cepanjem ( $m/z$  267,27) kao i (iii) prisustvo fragmenta nastalog gubitkom molekula vode iz  $[M+H]^+$  molekularnog jona ( $m/z$  350,29) (Leipert et al., 2017; Morin et al., 2003). Slično tome, druge AHL vrste kraćeg acilnog lanca identifikovane su na  $m/z$  284,2 (C12-HSL),  $m/z$  312,3 (C14-HSL) i  $m/z$  340,3 (C16-HSL, N-heksadekanoil homoserin lakton). N-3-okso-oktadekanoil homoserin lakton (3-okso-C18-HSL) detektovan je u tragovima na  $m/z$  382,3 (Slika 26a). Pored toga, jasno izražen pik utvrđen je na  $m/z$  400,3 i izolovan kao  $MS^2$  prekursor jon koji je dao značajne podatke o strukturi analiziranih molekula. Analizom odgovarajućeg MALDI  $MS^2$  spektra (Slika 26b) ustanovljeno je prisustvo zajedničkog jona na  $m/z$  102,06 ali takođe i jona koji nastaje gubitkom vode iz protonovanog molekularnog jona ( $m/z$  382,29).



**Slika 26.** MALDI MS analiza *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta. (a) MALDI MS spektar *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta snimljen u pozitivnom refleksionom modu. (b) MS<sup>2</sup> spektar jona prekursora detektovanog na  $m/z$  400,3. U prilogu je data relativna struktura AHL molekula. Položaj hidroksilnih grupa predstavljen je proizvoljno.



**Slika 27.** MALDI MS<sup>2</sup> analiza N-oktadekanoil homoserin laktona (C<sub>18</sub>-HSL). Pozitivni jon u MS<sup>2</sup> spektru jona prekursora (C<sub>18</sub>-HSL) detektovan je na  $m/z$  368,3. Relativna struktura C<sub>18</sub>-HSL molekula predstavljena je u zagradi.

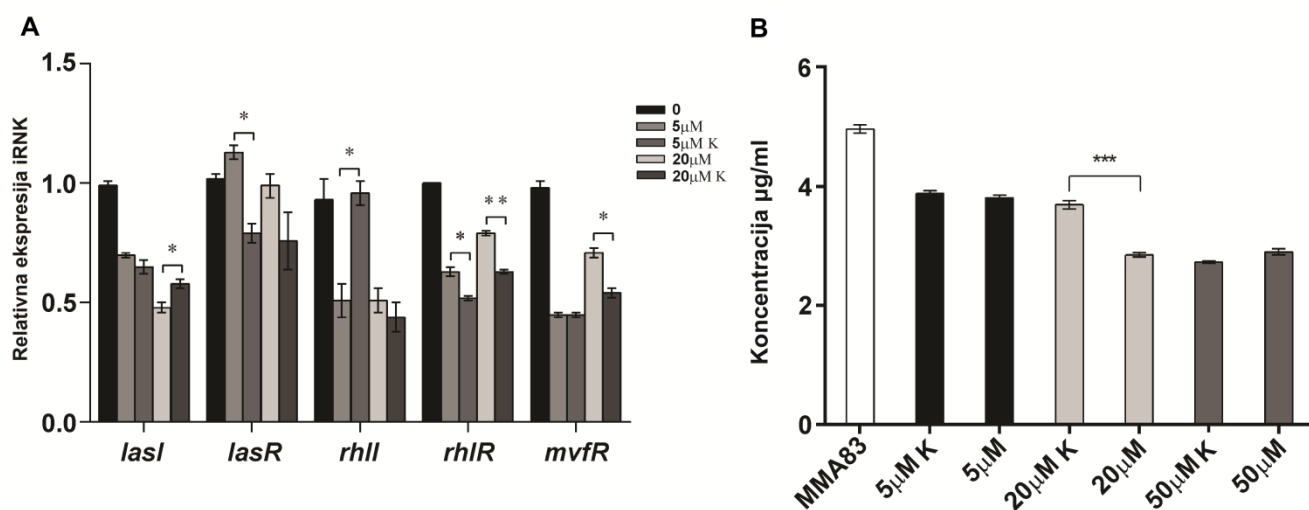


#### 4.14. Komercijalni C18-HSL redukuje produkciju piocijanina i ekspresiju *lasI* gena *P. aeruginosa* MMA83

Sa ciljem ispitivanja QSI potencijala komercijalnog C18-HSL, analizirani su njegov uticaj na ekspresiju QS gena i produkciju piocijanina na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83.

Rezultati transkripcione analize ukazuju da je C18-HSL u koncentraciji od 20  $\mu$ M doveo do statistički značajnog smanjenja ekspresije *lasI* gena soja MMA83. Međutim, tretman sa definisanim koncentracijama (5  $\mu$ M i 20  $\mu$ M) komercijalnog C18-HSL nije doveo do značajnijeg smanjenja ekspresije ostalih QS gena *P. aeruginosa* (Slika 28A).

Ispitivanjem uticaja C18-HSL na produkciju faktora virulencije ustanovljeno je da je došlo do iako malog, statistički ipak značajnog smanjenja produkcije piocijanina od strane soja *P. aeruginosa* MMA83 u prisustvu 20  $\mu$ M C18-HSL (Slika 28B).

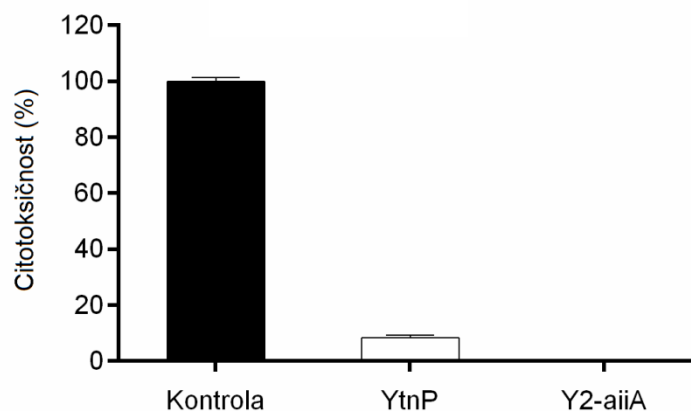


**Slika 28.** Ispitivanje QSI uticaja komercijalnog C18-HSL na *P. aeruginosa* MMA83. (A) Promene relativnog nivoa ekspresije iRNK QS gena *P. aeruginosa* MMA83 bez i sa tretmanom komercijalnog C18-HSL. Geni analizirani u ovom eksperimentu deo su tri *P. aeruginosa* QS mreže (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *mvfR*). Rezultati dobijeni RT-qPCR analizom normalizovani su u odnosu na *rpsL* gen koji kodira protein ribozoma koji je uzet kao interna kontrola. (B) Promene u produkciji piocijanina nakon tretmana *P. aeruginosa* MMA83 sa komercijalnim C18-HSL. "C" na oba grafika predstavlja DMSO kontrolu. Studentov *t*-test korišćen je kako bi se izvršilo poređenje razlika između kontrolnih i eksperimentalnih grupa (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.15. Laktonaze soja *B. cepacia* BCC4135 ne ostvaruju citotoksičan efekat na HaCaT keratinocite

Kako bi se ustanovilo da li *B. cepacia* BCC4135 laktonaze ostvaruju citotoksičan efekat na ćelije čoveka, kao model sistem korišćen je ćelijska linija HaCaT humanih keratinocita.

Rezultati dobijeni primenom LDH eseja ukazuju da nijedna od BCC4135 rekombinantnih laktonaza ne ostvaruje statistički značajan citotoksični efekat na HaCaT ćelije u primenjenim dozama od 10 µg/ml (Slika 29).



**Slika 29.** Analiza citotoksičnog efekta *B. cepacia* BCC4135 rekombinantnih laktonaza na HaCaT keratinocite čoveka. Nivo citotoksičnosti YtnP i Y2-aiiA enzima ispitan je upotrebom LDH eseja. Dobijeni rezultati izraženi su kao procentualne vrednosti i normalizovani su u odnosu na negativnu kontrolu.

Nivo laktat dehidrogenaze u supernatantu tretiranih ćelija detektovan je na niskom nivou u slučaju primene YtnP enzima (8,3%), dok nakon tretmana keratinocita čoveka sa Y2-aiiA rekombinantnom laktonazom nivo LDH nije bio detektabilan.

**Diskusija**

## 5. DISKUSIJA

Antimikrobna rezistencija bakterija smatra se jednom od najznačajnijih pretnji po javno zdravlje. Prekomerna upotreba i zloupotreba antibiotika u prošlosti, posebno u oblasti humane medicine, veterine i poljoprivrede dovela je do brze pojave i širenja višestruko rezistentnih izolata (MDR) među klinički značajnim bakterijskim vrstama. Kao posledica toga, mnogi antimikrobni lekovi izgubili su svoju efikasnost. Ovaj problem posebno zabrinjava imajući u vidu pojavu bakterijskih izolata rezistentnih na sve klase antibiotika dostupnih na tržištu, kao i nedostatak uspešnih mera prevencije širenja rezistencije. Stoga je prepoznat značaj razvoja novih antibakterijskih agenasa efikasnih protiv MDR patogena.

Istraživanja u oblasti antivirulentne terapije doživela su ekspanziju poslednjih 20-ak godina, a potpomognuta su novim saznanjima o bakterijskoj patobiologiji. U prošloj deceniji identifikovane su brojne nove mete antivirulentne terapije zasnovane na prirodnom fenomenu utišavanja međucelijske komunikacije bakterija (QS) i uspešno su uspostavljene strategije pronalaska novih terapeutika (Mühlen & Dersch, 2016).

*P. aeruginosa* jedan je od najznačajnijih oportunističkih humanih patogena, pozicioniran na sam vrh liste prioriternih bakterija za koje je urgentno potreban pronalazak novih antimikrobnih lekova. Izuzetna plastičnost genoma *P. aeruginosa* i sposobnost usvajanja stranih gena, uključujući gene za rezistenciju na antibiotike, omogućili su opstanak ovog mikroorganizma na gotovo svim staništima. Ovakva adaptabilnost i plastičnost genoma takođe ukazuju da *P. aeruginosa* može biti rezervoar rezistencije i na taj način ostvariti vezu između sredinske i rezistencije u bolničkim uslovima (Arzanlou et al., 2017). *P. aeruginosa* poseduje gotovo sve do sada opisane mehanizme rezistencije na antibiotike (Oliver et al., 2015), stoga je lečenje infekcija izazvanih ovom bakterijskom vrstom vrlo otežano usled ograničenih terapijskih mogućnosti. Sve učestalija pojava MDR i ekstremno rezistentnih (XDR) kliničkih izolata *P. aeruginosa* usmerila je aktuelna istraživanja ka alternativnim terapijskim pristupima i primeni bakteriofaga, vakcina i molekula koji za cilj imaju utišavanje međucelijske komunikacije.

Multispecijske socijalne interakcije su od suštinske važnosti za oblikovanje patogenosti bakterija (O'Brien & Fothergill, 2017). Interakcije između različitih mikroorganizama unutar polimikrobnih zajednica mogu uticati na patogenezu, otpornost na antibiotike i napredovanje bolesti. Međutim, često nije jednostavno utvrditi da li je klinička slika uzrok ili posledica ovih interakcija. Takođe, uloga nekih mikroorganizama u polimikrobnoj zajednici je mnogo suptilnija, što znači da ne moraju biti prepoznati kao patogeni *per se*, već patogeni potencijal ostvaruju kroz interakciju sa drugim mikroorganizmima. *P. aeruginosa* koristi kooperativnu i kompetitivnu strategiju radi osvajanja različitih ekoloških niša. Itekako je poznato da sekundarni metaboliti *P. aeruginosa* ostvaruju uticaj na susedne mikroorganizme. Kao odgovor na *P. aeruginosa*, susedni mikroorganizmi primenjuju raznolike odbrambene mehanizme. Jedna od tih odbrambenih strategija je utišavanje međucelijske komunikacije ovog patogena. Do danas su opisani brojni utišivači QS sistema (QQ molekuli), poreklom iz najrazličitijih izvora (Grandclément et al., 2016). Ono što je, međutim, ostalo manje poznato je kako mikroorganizmi koji tokom infekcije domaćina kolonizuju ista tkiva i organe kao i

*P. aeruginosa*, kompetiraju za ograničene resurse posredstvom utišavanja njegove međucelijske komunikacije.

S tim u vezi, ideja ovog istraživanja bila je da nove, potencijalno efikasne QQ molekule tražimo među mikroorganizmima koji tokom infekcije domaćina dele istu ekološku nišu sa *P. aeruginosa*. Iako je ova bakterijska vrsta jedan od najkorišćenijih model sistema prilikom ispitivanja antivirulentnog potencijala QSI i QQ molekula, većina dosadašnjih istraživanja bazirala se na upotrebi laboratorijskih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i PA14 kao model sistema (Diggle et al., 2007; Welsh & Blackwell, 2016; Fan et al., 2017; Dong et al., 2018), dok su podaci o utišavanju QS sistema kliničkih izolata *P. aeruginosa* veoma oskudni (Guendouze et al., 2017). Stoga je jedan od zadataka našeg istraživanja bio da antivirulentni potencijal novih QSI/qq molekula ispitamo na kliničkom izolatu *P. aeruginosa* MMA83, soju od velikog kliničkog značaja, čiji je MDR fenotip u korelaciji sa teškim ishodom infekcije (Jovicic et al., 2011).

U okviru ove teze analizirano je prisustvo QQ fenotipa kod kliničkih izolata sa teritorije grada Beograda. Prilikom selekcije, od 19 sojeva sa QQ fenotipom, izdvojila su se dva izolata *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135 koja su na osnovu inicijalne analize pokazala najbolje rezultate, u smislu veličine zone inhibicije produkcije ljubičastog pigmenta violaceina biosenzor soja *C. violaceum* CV026, kao i na osnovu stabilnosti i perzistentnosti produkcije QQ molekula kroz faze rasta. Pored toga, još jedan od kriterijuma za odabir ovih izolata za detaljnu karakterizaciju bila je i različita priroda QQ molekula koje proizvode ovi sojevi.

### 5.1. *Delftia tsuruhatensis* 11304 je izvor QSI molekula

Poimanje značaja bakterijske vrste *Delftia tsuruhatensis* doživelo je potpuni zaokret od bakterije koja pospešuje rast biljaka i predstavlja izvor antimikrobnih jedinjenja (Tejman-Yarden et al., 2019), do problematičnog humanog patogena koji se sve učestalije izoluje iz respiratornog trakta, krvi i urina pacijenata (Guo et al., 2016; Ranc et al., 2018). Međutim, postoji značajna neusaglašenost između rastuće važnosti *Delftia* izolata i genomskih podataka o ovoj vrsti. Na osnovu pretrage javno dostupnih baza podataka, može se uočiti da su informacije o genomima *D. tsuruhatensis* malobrojne, te su jedini za sada dostupni podaci deponovani u NCBI bazi o sredinskom izolatu *D. tsuruhatensis* MTQ3 (Guo et al., 2016). Stoga je nemoguće sa sigurnošću govoriti o poreklu *D. tsuruhatensis* 11304 analiziranom u ovoj studiji, bilo da je on poreklom iz bolničke sredine, ili je u pitanju sredinski izolat koji je u bolničku sredinu unet posredstvom pacijenta. Ono što svakako ukazuje na mogući virulentni fenotip i sam klinički značaj ovog izolata jeste prisustvo genetičkih determinanti za sintezu siderofora, kapsula i alginata. Pored toga, u genomu ovog soja detektovano je prisustvo genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike kao što su  $\beta$ -laktamaze i RND efluks pumpe, što bi moglo doprineti sveukupnom patogenom potencijalu ovog soja i pružiti uvid u genetičku osnovu patogenosti *D. tsuruhatensis* uopšte.

U literaturi već postoji podatak o QQ potencijalu *D. tsuruhatensis* vrste. Singh i saradnici (Singh et al., 2017) ustanovili su da diizooktil estar 1,2 benzendikarboksilne kiseline koju proizvode *D. tsuruhatensis* efikasno utišava QS sistem soja *P. aeruginosa* PAO1. Međutim, ono što je značajno istaći jeste da je diizooktil estar 1,2 benzendikarboksilne kiseline poznat po još nekoliko sinonima (bis-2-etilheksil ftalat, diizooktil ftalat) okarakterisan kao kontaminant laboratorijskih uzoraka prilikom

korišćenja plastične laboratorijske opreme (tube, nastavci), s obzirom da ovo jedinjenje ima široku primenu kao plastifikator (Nguyen et al., 2008; Reid et al., 2007). S tim u vezi, testiran je efekat komercijalno dostupnih bis-2-etilheksil ftalata i diizooktil ftalata u širokom opsegu koncentracija na QS sistem *C. violaceum* CV026 i na formiranje biofilma *P. aeruginosa*, te je pokazano da ova jedinjenja ne ostvaruju QSI efekat (Malešević et al., 2019). U skladu sa dobijenim rezultatima naš cilj bio je da otkrijemo molekul(e) kliničkog izolata *D. tsuruhatensis* 11304 koji leže u osnovi njegove QSI aktivnosti. Ukupni etil-acetatni ekstrakt *D. tsuruhatensis* 11304 pokazao je izvanrednu sposobnost utišavanja QS sistema MDR kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, redukujući njegov virulentni fenotip kroz smanjenje sposobnosti formiranja biofilma kao i produkcije ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, piocijanina i ramnolipida. Međutim, rezultate dobijene analizom potencijala QSI ekstrakata iz različitih studija vrlo je teško međusobno uporediti, usled primenjivanja različitih metoda kultivacije i ekstrakcije QSI aktivnih molekula kao i primene brojnih drugih parametara. Primera radi, ustanovljeno je da je za oko 90-94% smanjena produkcija violaceina kod *C. violaceum* CV026 nakon tretmana sa 3-4 mg/ml ekstrakta *Stenotrophomonas maltophilia* i *Melicope lunu-ankenda* (Tan et al., 2012; Singh et al., 2013), dok je isti efekat postignut sa znatno većom koncentracijom ekstrakta filozofskih bakterija (20 mg/ml) (Theodora et al., 2019).

Na osnovu istraživanja sprovedenih u poslednje tri decenije, nedvosmisleno je ustanovljeno da predominantna životna forma bakterija predstavlja život u zajednici biofilma, dok se planktonska forma smatra samo prelaznom fazom u životnom ciklusu bakterijske populacije. Prelazak sa planktonskog načina života na život u biofilmu je sled događaja koji prati tranziciju akutne u hroničnu infekciju, te se smatra da je perzistentnost infekcije *P. aeruginosa* omogućena sposobnošću ove vrste da formira biofilm. Bakterijske ćelije unutar biofilma podležu učestalim genetičkim, metaboličkim, fiziološkim i fenotipskim promenama usmerenim ka preživljavanju u mikrosredini sa ograničenom dostupnošću nutrijenata. Ovo svojstvo *P. aeruginosa* omogućava uspešnu kolonizaciju, usled značajne tolerancije na antibiotike i otpornosti na imunski sistem domaćina. Stoga formiranje biofilma na različitim površinama služi kao značajan izvor infekcije (Azam & Khan, 2019). Smatra se da je oko 80% hroničnih i rekurentnih bakterijskih infekcija kod ljudi nastalo kao posledica sposobnosti bakterija da formiraju biofilme (Sharma et al., 2019). S tim u vezi, predložene su tri nebaktericidne strategije borbe protiv patogenih bakterija koje imaju sposobnost formiranja biofilma: (i) sprečavanje vezivanja bakterija za površinu, (ii) ometanje razvoja biofilma i/ili uticaja na arhitekturu biofilma radi poboljšanja prodora antimikrobnih lekova, i (iii) delovanje na proces sazrevanja biofilma kao i/ili indukciju njegove disperzije i degradacije (Rasamiravaka et al., 2015; Masák et al., 2014). Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja ukazuju da je formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83 u značajnoj meri smanjeno tretmanom pomoću *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta, a da pritom sam ekstrakt nije uticao na rast bakterijskih ćelija. Redukcija sposobnosti formiranja biofilma posredstvom 11304 QSI ekstrakta ostvarena je na dozno-zavisan način, i u skladu je sa dosadašnjim literaturnim podacima vezanim za primenu drugih QSI ekstrakata (Singh et al., 2013; Cho et al., 2013). Dekompozicija biofilma ima veliki značaj sa terapeutskog aspekta jer podrazumeva intervencije koje se primenjuju nakon što je biofilm formiran. Ova strategija uključuje nekoliko pristupa čije su mete komponente matriksa biofilma (EPS, eDNK, lipidi, proteini i amiloidni agregati) i molekuli koji učestvuju u disperziji biofilma (c-di-GMP, poliamini) (Jiang et al., 2020). Eksperimentalno je potvrđeno da farnezol ima negativno dejstvo na sintezu EPS-a, dok disperzin B i glikozid hidrolaze PelA i PslG ostvaruju uticaj na dekompoziciju biofilma degradacijom EPS-a. Enzimi cistein proteaza i DNaza I deluju na druge komponente matriksa biofilma *P. aeruginosa* (proteine, eDNK) (Waryah et al., 2017; Marx et al., 2020; Jiang et al., 2020). Takođe, azot-monoksid u netoksičnim dozama utiče na smanjenje koncentracije c-di-GMP što je signal za disperziju biofilma (Barraud et al., 2015). Međutim,

rezultati našeg istraživanja pokazali su da narušavanje strukture već formiranog biofilma nije postignuto primenom QSI ekstrakta, što bi moglo ukazivati na nepropustljivost matriksa biofilma za aktivne komponente ekstrakta kao i na drugačiji mehanizam delovanja *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na QS sistem *P. aeruginosa* MMA83.

Patogeni profil *P. aeruginosa* takođe je u korelaciji sa njegovom sposobnošću produkcije ekstracelularnih faktora virulencije poput elastaza, piocijanina i ramnolipida koje ovom patogenu služe za invaziju tkiva domaćina i potpomažu formiranje biofilma kao i njegovo rasejavanje. Produkcija faktora virulencije je metabolički veoma zahtevan proces koji iziskuje angažovanje cele bakterijske zajednice posredstvom sistema međućelijske komunikacije. Poznato je da su ovi procesi pod kontrolom *las*, *rhl* i *pqs* QS sistema, stoga je razumevanje regulatornih mehanizama zahvaljujući kojima *P. aeruginosa* upravlja ekspresijom gena odgovornih za sintezu faktora virulencije ključno za razvoj alternativnih terapijskih opcija sa ciljem kontrole i sprečavanja infekcija (Lee & Zhang, 2015). Dokumentovano je da analozi C4-HSL poreklom iz ekstrakta *Rhizobium* sp. NAO1 smanjuju produkciju elastaza i siderofora od strane *P. aeruginosa* (Chang et al., 2017), dok ekstrakt rizosferne biljke *S. maltophilia* sprečava pokretljivost i produkciju piocijanina kod *P. aeruginosa* (Singh et al., 2013). Rezultati prikazani u okviru ove studije ukazuju da *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakt ostvaruje znatan uticaj na smanjenje produkcije elastaza, piocijanina i ramnolipida *P. aeruginosa* MMA83 na dozno-zavisan način. RT-qPCR analizom potvrđen je antivirulentni efekat 11304 QSI ekstrakta kroz značajno smanjenje ekspresije autoinducer sintaze i transkripcionog aktivatora sva tri analizirana QS sistema - *las*, *rhl* i *pqs*. Budući da 11304 QSI ekstrakt dovodi do promena na nivou transkripcije, jedan od pretpostavljenih mehanizama delovanja bioaktivnih molekula iz QSI ekstrakta je posredstvom njihove antagonističke aktivnosti. To podrazumeva da bioaktivni molekuli sprečavaju vezivanje QS signala za receptor i/ili modifikuju konformaciju kompleksa signal-receptor, čime blokiraju njegovu dimerizaciju i interakciju sa odgovarajućim regionom DNK (promotorskom sekvencom) ili RNK polimerazom.

Uzevši u obzir da klinički izolati *P. aeruginosa* veoma često poseduju MDR ili čak XDR fenotip, nova strategija u kliničkoj praksi prilikom lečenja infekcija izazvanih ovakvim sojevima bi mogla biti kombinovana upotreba antibiotika i druge neantibiotske aktivne komponente. Imajući takođe u vidu da su antibiotici gotovo u potpunosti neefikasni prilikom tretiranja bakterija u biofilmu, novija istraživanja usmerena su ka primeni QQ agenasa koji bi onemogućili formiranje ili narušili strukturu formiranog biofilma i na taj način izložili bakterije direktnom delovanju antibiotika. Stoga se smatra da sinergističko delovanje antibiotika i anti-QS agensa ima za cilj smanjenje primenjene doze antibiotika i povećanje njihove efikasnosti (Jiang et al., 2019). Takođe, narušavanje QS sistema primenom kombinovane terapije moglo bi značajno smanjiti opstanak *P. aeruginosa* u uslovima stresa (Fong et al., 2018). U studiji koju je sprovedla Rezzoagli sa saradnicima (Rezzoagli et al., 2019) ustanovljeno je da primena QSI inhibitora furanona C30 i galijuma u kombinaciji sa klinički relevantnim antibioticima ciprofloksacinom, meropenemom, kolistinom i tobramicinom može dovesti do inhibicije rasta kod većine klonova *P. aeruginosa* rezistentnih na antibiotike. Zatim, u okviru pomenutog istraživanja pokazano je da primena kombinovane terapije može u potpunosti ukinuti rezistentni fenotip, ukazujući na značaj ovog vida terapije u tretmanu infekcija a takođe i u ograničavanju širenja antibiotske rezistencije. Značaj primene QS inhibitora u smanjenju rezistencije *P. aeruginosa* PAO1 kroz sinergistički efekat sa klinički relevantnim antibioticima dokumentovan je u još nekoliko slučajeva (Brackman et al., 2011; Ding et al., 2011; Yang et al., 2012). Rezultati dobijeni u našoj studiji primenom metode šahovske table pokazali su da je osetljivost MDR kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 na meropenem i gentamicin znatno povećana kroz sinergističko delovanje

*D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta sa primenjenim antibioticima, ukazujući da bi aktivne komponente iz ekstrakta mogle imati primenu u kombinovanoj terapiji sa klinički najznačajnijim antibioticima koji se koriste u tretmanu infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa*.

U svrhu ispitivanja sastava *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta primenjena je MALDI MS instrumentalna metoda koja je ukazala na prisustvo N-acil-homoserin laktone (AHL) sa dužinom acilnog lanca od C12 do C18 atoma, pri čemu je najdominantnije bio zastupljen N-oktadekanoil homoserin lakton (C18-HSL). Zanimljivo je, takođe, navesti da je dominantni pik od  $m/z$  400,3 izolovan i analiziran kao prekursor jon koji daje važne strukturne podatke. Odgovarajući MALDI MS<sup>2</sup> spektar ukazao je na pojavu zajedničkog jona na  $m/z$  102,06 ali i jona nastalog gubitkom vode iz protonovanog molekularnog jona ( $m/z$  382,29). Detektovana su takođe dva pika na  $m/z$  281,25 i 263,24, čije se molekulske mase poklapaju sa molekulskim masama jedinjenja kojima nedostaje jedan ili dva molekula vode sa acilnog lanca, što ukazuje na moguće prisustvo dve hidroksilne grupe na acilnom lancu. Nažalost, nijedan od dobijenih fragmenata nije pomogao da se ustanovi položaj tih hidroksilnih grupa; ipak, na osnovu podataka iz literature možemo pretpostaviti da je jedna hidroksilna grupa smeštena na poziciji 3 (C3) acilnog lanca (Watson et al., 2002), dok je pozicija druge hidroksilne grupe za sada nedefinisana. Stoga se može tvrditi da je u sastavu *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta prisutna nova AHL vrsta dihidroksi-N-oktadekanoil homoserin lakton (dihidroksi-C18-HSL). C18-HSL je prvi put otkriven kod zemljišne bakterije *Sinorhizobium meliloti* kod koje posredstvom QS sistema ostvaruje ulogu u simbiozi sa leguminoznom biljkom *Medicago sativa* (Marketon et al., 2002). Sa druge strane, u okviru ove studije po prvi put je identifikovan dihidroksi-C18-HSL prirodnog porekla. Činjenica da komercijalni C18-HSL redukuje ekspresiju *lasI* QS gena i produkciju pirocijanina, ukazuje na njegov uticaj na virulentni potencijal *P. aeruginosa* MMA83. Otkriće do koga smo došli u okviru ovog istraživanja je stoga od izuzetnog značaja, jer je prethodno pokazano da kod određenih bakterijskih vrsta AHL dugog lanca interferiraju sa QS sistemom posredovanim AHL kratkog lanca (McClellan et al., 1997; Swem et al., 2009). Na primer, C10-HSL nema mogućnost da aktivira CviR zavisnu transkripciju kod *C. violaceum* CV026, već nasuprot tome svoju funkciju ostvaruje kao antagonist u prisustvu nativnog autoinducera C6-HSL. Pored toga, pokazano je da se AHL dugog lanca C12- i C14-HSL vezuju sa istim afinitetom za CviR kao i C6-HSL, ali imaju antagonističko dejstvo. Vezujući se za CviR, AHL dugog lanca indukuju konformacionu modifikaciju receptora, sprečavajući njegovu interakciju sa RNK polimerazom i na taj način onemogućavaju aktivaciju transkripcije (Swem et al., 2009; Chen et al., 2011). S tim u vezi, mogli bismo spekulirati da AHL dugog lanca poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta među kojima su najdominantnije prisutni C18-HSL i po prvi put identifikovani dihidroksi-C18-HSL mogu biti odgovorni za interferenciju sa QS sistemom *P. aeruginosa* MMA83 i ujedno za smanjenje njegovog virulentnog potencijala. Shodno tome, moguće je napraviti analogiju sa *C. violaceum* CV026 QS sistemom, s obzirom da *P. aeruginosa* ne proizvodi AHL čiji su bočni lanci duži od C12 atoma (Soukarieh et al., 2018). Naše pretpostavke su u skladu sa tvrdnjama do kojih su došli Zhu i saradnici (Zhu et al., 1998) ustanovivši da jedan od najjačih antagonista TraR transkripcionog aktivatora, analog 3-okso-C8-HSL autoinducera *Agrobacterium tumefaciens*, poseduje hidroksilni ostatak na poziciji 3 acilnog lanca. Autori pomenute studije zatim tvrde da je dužina bočnog acilnog lanca jedna od ključnih odrednica u ostvarivanju antagonističkog delovanja sintetičkih AHL korišćenih u njihovom model sistemu. Ono što svakako ne treba zanemariti kada su rezultati našeg istraživanja u pitanju jeste da se ostvarena QSI aktivnost ne može pripisati samo C18-HSL, već orkestriranoj aktivnosti nekoliko aktivnih molekula poreklom iz ekstrakta, usled ograničenih efekata komercijalnog C18-HSL u poređenju sa ukupnim *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstraktom. Na smanjenje efekta komercijalnog C18-HSL mogu uticati njegova termosenzitivnost (Yates et al., 2002) kao i ograničena rastvorljivost u



odgovarajućem rastvaraču korišćenom u funkcionalnim esejima. Imajući u vidu da su QSI molekuli poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 izuzetno termostabilni, dok literaturni podaci ukazuju da je C18-HSL kao glavna komponenta ekstrakta termosenzitivan, što bi moglo biti pokazatelj da se u 11304 QSI ekstraktu nalaze dodatne komponente koje stabilizuju prisutni C18-HSL i/ili sa njime ostvaruju sinergistički ili kumulativni efekat. Stoga će naša buduća istraživanja imati za cilj razdvajanje i identifikaciju svih komponenata prisutnih u *D. tsuruhatensis* 11304 etil-acetatnom ekstraktu kao i ispitivanje QSI aktivnosti svake od pojedinačnih komponenata. Osim toga, jedan od budućih zadataka jeste ispitivanje citotoksičnosti i farmakoloških svojstava (ukoliko se pokaže odsustvo citotoksičnosti) molekula poreklom iz QSI ekstrakta nakon njihove izolacije i prečišćavanja. S obzirom da ukupni QSI ekstrakt pored bioaktivnih molekula sadrži i mnoge druge komponente (nečistoće, komponente poreklom iz medijuma za kultivaciju, produkte metabolizma bakterija), te se kao takav ne može primeniti u terapiji, ispitivanje njegovog citotoksičnog efekta nije bilo od važnosti za ovo istraživanje.

## 5.2. *Burkholderia cepacia* BCC4135 ostvaruje antivirulentni potencijal posredstvom QQ laktonaza

Vrste pripadnici *Burkholderia cepacia* kompleksa (Bck) široko su rasprostranjene u prirodi. Prilagodljivost na različite uslove životne sredine pripisuje se njihovim izuzetno velikim genomima sačinjenim od dva ili tri replikona (hromozoma i megaplazmida), prisustvu brojnih insercionih sekvenci, kao i njihovoj nutritivnoj raznolikosti, odnosno sposobnosti da koriste širok spektar različitih jedinjenja kao izvora ugljenika i energije za ostvarivanje metaboličkih aktivnosti (Parke & Gurian-Sherman, 2001). Brza adaptacija *Burkholderia* vrsta na različite ekološke niše takođe je omogućena njihovim raznolikim fiziološkim svojstvima (Vial et al., 2011). Za opstanak *B. cepacia* u bolničkoj sredini prevashodno je zaslužna njihova izuzetna otpornost na antibiotike i dezinficijense, kao i visokoefikasna transmisija između pacijenata, posebno između pojedinaca obolelih od cistične fibroze. Klinički ishod kolonizacije i infekcije izazvane Bck bakterijama kod pacijenata sa cističnom fibrozom može značajno varirati i uključuje tranzijentnu infekciju, dugoročnu hroničnu infekciju ili brzo pogoršanje kliničke slike, što za posledicu može imati pojavu ozloglašnog "cepacia sindroma" (Parke & Gurian-Sherman, 2001). Ishod infekcije je izuzetno kompleksan, i pored toga što zavisi od patogenog potencijala Bck vrsta, na njega u velikoj meri utiču interakcije između domaćina i uzročnika infekcije, kao i međusobne interakcije različitih patogena koji vrše kolonizaciju tkiva domaćina (Govan et al., 2007). Soj *B. cepacia* BCC4135 koji je bio predmet proučavanja ove studije izolovan je iz pacijenta obolelog od cistične fibroze. Na osnovu *in silico* analize genomske sekvence BCC4135 ustanovljeno je da ovaj klinički izolat poseduje značajan broj gena koji pripadaju rezistomu i virulomu, što ukazuje na moguća adaptabilna svojstva ovog soja na bolničku sredinu i domaćina (Vial et al., 2011; Tedesco et al., 2015). Imajući u vidu da BCC4135 pripada novom sekvencnom tipu ST1485, moglo bi se reći da je ovo novi soj u bolničkom okruženju i da je dospeo iz spoljašnje sredine, ili da prethodno nije detektovan usled odsustva patogenih svojstava i samim tim nemogućnosti da uzrokuje klinički značajne infekcije. Ovoj pretpostavci ide u prilog i činjenica da u slučaju Bck vrsta ne postoji jasna distinkcija između izolata sredinskog i kliničkog porekla, te je opšte prihvaćeno da je prirodno okruženje potencijalni izvor Bck izazvanih infekcija (Vasiredy et al., 2018).

Iako se dugo smatralo da bakterijske infekcije prvenstveno svedoče o kompleksnom odnosu između patogena i domaćina, kroz progresivno poimanje složenosti polimikrobnih zajednica postaje sve jasnije da interakcije između bakterijskih patogena i mikrobne zajednice unutar koje obitavaju

moгу uticati na patogenezu, antimikrobnu rezistenciju i napredovanje bolesti. Uloga multispecijskih socijalnih interakcija u oblikovanju patogenog potencijala *P. aeruginosa* naročito je dobro proučena kod pacijenata obolelih od cistične fibroze (O'Brien & Fothergill, 2017). Imajući u vidu da ovaj patogen dominira u polimikrobnoj zajednici kod starijih osoba obolelih od cistične fibroze, istiskujući ostale članove te zajednice, jasno je da *P. aeruginosa* koristi raznolike mehanizme koji mu omogućavaju kolonizaciju tkiva domaćina i perzistentnost infekcije. Stoga, susedni mikroorganizmi reaguju aktivirajući mnogobrojne odbrambene sisteme. *B. cepacia*, drugi značajan kolonizator pluća osoba obolelih od cistične fibroze koristi kooperativne i kompetitivne mehanizme kako bi se izborila za opstanak u zajednici sa *P. aeruginosa*. Poznato je da članovi Bck formiraju biofilm sa *P. aeruginosa* tako što uspostavljaju kompleksnu mrežu interakcija koja čak dovodi do razmene genetičkog materijala (Eberl & Tümmler, 2004). Međutim, u literaturi su češće opisani primeri kompetitivnog delovanja ova dva patogena. Navedeni podaci ukazuju da populacija *Burkholderia* vrsta učestalo vrši invaziju populacije *P. aeruginosa* (Schwab et al., 2014) i obrnuto (Bragonzi et al., 2012; Costello et al., 2014). Bazirajući se na ovim strategijama, sekundarni metaboliti koje proizvode prirodni kompetitori iskorišćeni su za razvoj novih terapeutika kako bi se ciljali specifični uzročnici infekcija. S tim u vezi, bakteriocin tailocin poreklom iz *Burkholderia* predložen je kao potencijalni terapeutik sa antimikrobnim delovanjem usmerenim ka *P. aeruginosa* (Yao et al., 2017). U skladu sa navedenim činjenicama, naša pretpostavka bila je da tokom infekcije *B. cepacia* uspeva da se izbori za istu nišu sa *P. aeruginosa* posredstvom utišavanja QS sistema svog protivnika. Zaista, u okviru ove studije identifikovane su dve QQ laktonaze poreklom iz soja *B. cepacia* BCC4135 sa obećavajućim anti-QS potencijalom. Kao i većina AHL laktonaza, oba enzima proučavana u ovoj tezi pripadaju superfamiliji metalo- $\beta$ -laktamaza i poseduju HXHXDH cink-vezujući motiv u aktivnom mestu kao i aspartat i histidin koji su neophodni za degradaciju AHL (Thomas et al., 2005). Izuzevši prisustvo konzervisane sekvence, QQ laktonaze su veoma raznolika grupa enzima. Filogenetskom analizom ustanovljeno je da YtnP i Y2-aiiA dele oko 40% identičnosti aminokiselinske sekvence sa filogenetski najbližim AHL laktonazama, što takođe potvrđuje veliki diverzitet ove grupe enzima (Tang et al., 2015; Grandclément et al., 2016). Iako je za većinu do sada identifikovanih AHL laktonaza poznato da ne poseduju signalnu sekvencu, na osnovu predikcione analize utvrđeno je da bi Y2-aiiA mogla biti ekstracelularni enzim usled prisustva signalne sekvence, isto kao i MomL laktonaza poreklom iz *Muricauda olearia* (Tang et al., 2015). Bitno je istaći takođe da, iako u UniProt bazi podataka postoje deponovane sekvence pretpostavljenih QQ laktonaza poreklom iz *Burkholderia* vrsta, one su po prvi put eksprimirane i eksperimentalno validirane u okviru ove studije.

Ekspresija i prečišćavanje *B. cepacia* BCC4135 QQ enzima korišćenjem komercijalnog pQE30 sistema bila je moguća jedino u denaturišućim uslovima, usled formiranja inkluzionih tela, čak i u slučaju kultivacije na nižim temperaturama (23°C) i indukcijom sa veoma niskim koncentracijama IPTG (0,1 mM). Problem formiranja inkluzionih tela neretko se javlja prilikom ekspresije rekombinantnih AHL laktonaza (Park et al., 2003; Tang et al., 2015; Rusmana et al., 2017). Usled prisustva cisteina u aminokiselinskoj sekvenci QQ laktonaza poreklom iz *B. cepacia* BCC4135, pretpostavljena je mogućnost formiranja disulfidnih mostova između delova istog polipeptidnog niza kao i između dva polipeptidna niza, što može uzrokovati nastanak proteinskih agregata (inkluzionih tela) (Nagahara, 2011; Feige et al., 2018). Strategija dobijanja solubilnih aktivnih proteina iz inkluzionih tela u denaturišućim/renaturišućim uslovima primenom 8 M uree veoma je često predložena u metodološkim studijama (Grönlund et al., 2003; Yang et al., 2011; Dang et al., 2012; Upadhyay et al., 2016). S tim u vezi, u cilju prevazilaženja eksperimentalnih problema u okviru ovog istraživanja, primenjeno je prečišćavanje i renaturacija YtnP i Y2-aiiA rekombinantnih enzima u gradijentu uree (8 M - 0 M) na Ni-NTA agaroznoj afinitetnoj hromatografiji.

Termostabilnost predstavlja jedno od najpoželjnijih biotehnoških svojstava enzima koje ih čini pogodnim za proizvodnju u industriji i primenu u biomedicini. Ovo svojstvo daje enzimima mnoge prednosti kao što su brže i efikasnije prečišćavanje, duža stabilnost i pretpostavljena bolja aktivnost (Wohlgemuth et al., 2018; Zhang et al., 2019). Rezultati naše studije pokazali su da je temperaturni optimum za YtnP i Y2-aiiA isti kao i kod prethodno okarakterisane MomL laktonaze i iznosi 40°C, ali je nešto manji od AidB laktonaze poreklom iz *Bosea* sp. (60°C) (Zhang et al., 2019) i od AaL laktonaze izolovane iz termoacidofilne vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* (58,2°C) (Bergonzi et al., 2018). Temperaturni optimum je vrlo blizak fiziološkoj temperaturi (37°C) što nije iznenađujuće imajući u vidu da su BCC4135 laktonaze poreklom iz kliničkog izolata, čija je optimalna temperatura kultivacije 37°C. Bitno je naglasiti, takođe, da su obe laktonaze zadržale aktivnost na višim temperaturama, naročito YtnP sa 50% aktivnosti nakon tretmana na 70°C. U pogledu otpornosti na više temperature, oba QQ enzima pokazala su umerenu termostabilnost, koja je ipak značajna, imajući u vidu da je većina do sada identifikovanih termostabilnih AHL laktonaza izolovana iz termofilnih bakterijskih vrsta (Bergonzi et al., 2018; Seo et al., 2011).

Analizom enzimskog potencijala YtnP i Y2-aiiA ustanovljeno je da, u pogledu dužine bočnog acilnog lanca AHL, obe laktonaze pokazuju širok spektar supstratne specifičnosti i efikasnosti degradacije AHL molekula analiziranih u ovom istraživanju. YtnP enzim pokazao je veću specifičnost za AHL kratkih i srednje dugih bočnih acilnih lanaca, dok je Y2-aiiA pokazao značajnu efikasnost u degradaciji AHL kako kratkih tako i dugih acilnih lanaca, štaviše, sa većom specifičnošću za AHL dugog lanca. Takođe, uočeno je da jedino Y2-aiiA vrši degradaciju C14-HSL. Stoga bi ovaj rezultat mogao potvrditi našu pretpostavku da je razlika u supstratnoj specifičnosti ovih AHL laktonaza posledica njihove lokalizacije u ćeliji kao i funkcije. Od ranije je poznato da *B. cepacia* sintetiše AHL (Aguilar et al., 2003), stoga bi intracelularna YtnP mogla biti uključena u kontrolu sopstvenih AHL signala, dok bi ekstracelularna Y2-aiiA laktonaza usled šire supstratne specifičnosti mogla biti uključena u odgovor na QS signale drugih bakterija iz okruženja. Postoji mogućnost da *B. cepacia* koristi ovu strategiju u svrhu različite modulacije relativne koncentracije endogenih AHL kratkog i srednje dugog bočnog acilnog lanca i egzogenih AHL dugog lanca. Na ovaj način *B. cepacia* bi mogla autoregulisati QS signale unutar svoje ćelije i istovremeno interferirati sa QS sistemima drugih mikroorganizama sa kojima deli istu ekološku nišu. Ova tvrdnja bi takođe mogla biti potkrepljena činjenicom da transkripcija *ytnP* gena kroz faze rasta bakterijske kulture u potpunosti prati transkripciju QS gena (*anoI* i *anoR*). Relativni nivo iRNK intracelularne *ytnP* smanjuje se kada QS sistem nije aktivan (kasna stacionarna faza rasta), dok se nivo *y2-aiiA* iRNK i dalje povećava i dostiže maksimum u kasnoj stacionarnoj fazi rasta, na taj način vršeći utišavanje međućelijske komunikacije svojih kompetitora. Zatim, *B. cepacia* ne produkuje AHL dugog acilnog lanca (Sokol et al., 2007), stoga nema potrebu za laktonazama širokog spektra aktivnosti ukoliko su one uključene samo u regulaciju sopstvene QS mreže, tako da bi se razlika u supstratnoj specifičnosti ova dva enzima mogla smatrati posledicom njihove biološke uloge. Uočena zavisnost nivoa ekspresije gena i promotorske aktivnosti *B. cepacia* BCC4135 gena koji kodiraju laktonaze od faza rasta bakterijske kulture može ukazivati na različite metaboličke aktivnosti i regulaciju ovih laktonaza u QQ/QS mreži *B. cepacia*. Saznanja do kojih smo došli u skladu su sa rezultatima studije koju su objavili Mayer i saradnici (Mayer et al., 2018), a koji takođe tvrde da bi nivo ekspresije gena koji kodiraju laktonaze mogao biti nezavisan od QS sistema. Osim toga, da ekspresija AHL laktonaza može biti strogo regulisana pokazano je na primeru *Agrobacterium tumefaciens* kod koje je AHL laktonaza koju kodira *attM* gen eksprimirana samo kada je bakterijska kultura u stacionarnoj fazi rasta (Zhang et al., 2002).

Upotreba enzima koji vrše degradaciju QS signala smatra se najbolje proučenom i najučestalije primenjenom antivirulentnom strategijom (LaSarre & Federle, 2013). Prednost ove strategije pre svega se ogleda u činjenici da se ciljana degradacija QS signala odvija nakon što se enzim izluči u ekstracelularni medijum. Samim tim, meta odnosno QS molekul je dostupniji za razgradnju, te se stoga mogu izbeći poteškoće vezane za ulazak aktivnih molekula/enzima u ćeliju. Štaviše, s obzirom da je meta ekstracelularni faktor, pojava i širenje rezistencije na antivirulentne molekule su manje verovatni (Fetzner, 2015). Poznato je da formiranje biofilma i produkcija drugih faktora virulencije mogu biti oslabljeni kao posledica enzimske degradacije signalnih molekula (Grandclément et al., 2016). U brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama dokumentovana je efikasnost QQ laktonaza u degradaciji AHL signala kroz smanjenje virulentnog potencijala analiziranih model sistema. Prečišćena rekombinantna Aii810 laktonaza poreklom iz metagenoma kineskog tradicionalnog jela Mao-tofu u značajnoj meri smanjila je formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Fan et al., 2017). AiiK laktonaza izolovana iz *Kurthia huakuii* pokazala je izuzetan potencijal u sprečavanju formiranja biofilma, proizvodnje piocijanina i ekstracelularne proteolitičke aktivnosti *P. aeruginosa* PAO1 (Dong et al., 2018). Već pomenuta AaL laktonaza bila je efikasna u sprečavanju formiranja biofilma vrste *A. baumannii* na dozno-zavisan način (Bergonzi et al., 2018). Rezultati dobijeni u našoj studiji ukazuju na značajan potencijal YtnP i Y2-aiiA laktonaza u smanjenju virulentnog fenotipa kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, kroz onemogućavanje formiranja biofilma i produkcije ekstracelularnih faktora virulencije. Formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83 značajno je umanjeno nakon tretmana YtnP i Y2-aiiA laktonazama, bez uticaja na rast pojedinačnih ćelija u kulturi, što predočava da je izbegnuto stvaranje selektivnog pritiska za razvoj rezistencije. Mikrografije dobijene fluorescentnom mikroskopijom ukazuju da ekstracelularna laktonaza u izvesnoj meri pokazuje veću sposobnost sprečavanja formiranja biofilma, što je u skladu sa većom supstratnom specifičnošću ove laktonaze za AHL signalne molekule odgovorne za inicijalnu adheziju ćelija i formiranje biofilma *P. aeruginosa* (LaSarre & Federle, 2013). Takođe, ispitivan je i uticaj QQ enzima *B. cepacia* BCC4135 na produkciju elastaza, piocijanina i ramnolipida kao ključnih faktora za uspostavljanje punog patogenog potencijala *P. aeruginosa*. Dobijeni rezultati ukazuju da oba QQ enzima utiču na smanjenje virulentnog fenotipa *P. aeruginosa* i samim tim bi mogli sprečiti ili makar ublažiti bakterijsku infekciju posredstvom značajnog smanjenja produkcije ovih faktora virulencije. Anti-QS efekat YtnP i Y2-aiiA potvrđen je takođe i na transkripcionom nivou. Pogođena su dva glavna QS sistema vrste *P. aeruginosa* - *las* i *rhl*, koja kontrolišu produkciju faktora virulencije i formiranje biofilma. Pore toga, kombinacija enzima pokazala je značajnije rezultate u utišavanju QS sistema u odnosu na primenu svakog od enzima pojedinačno. Takođe, ustanovljeno je da YtnP i Y2-aiiA imaju mogućnost da utišaju i *pqs* QS mrežu *P. aeruginosa*, što je veoma značajno svojstvo koje je po prvi put otkriveno među laktonazama, pored do sada opisanih QQ enzima acilaze i dioksigenaze (Sio et al., 2006; Pustently et al., 2009). Važno je još pomenuti da je Y2-aiiA laktonaza bila efikasnija u smanjenju ekspresije svih analiziranih gena uključenih u QS sistem *P. aeruginosa* MMA83. Sumiranjem rezultata funkcionalne karakterizacije QQ enzima analiziranih u okviru ove studije, može se zaključiti da obe laktonaze imaju značajan terapijski potencijal ostvaren kroz smanjenje patogenosti *P. aeruginosa*.

Ispitivanje citotoksičnog efekta antivirulentnih agenasa na ćelije čoveka jedan od najbitnijih koraka u cilju njihovog uvrštavanja u kliničke studije i potencijalne buduće primene u kliničkoj praksi. Već je pomenuto da je do sada identifikovano mnoštvo jedinjenja koja imaju sposobnost interferencije sa QS sistemom *P. aeruginosa*, te da je njihova efikasnost veoma dobro potkrepljena brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama. Nažalost, većina okarakterisanih antivirulentnih agenasa je citotoksična ili pokazuje nepovoljna farmakološka svojstva, što ograničava njihovu primenu u kliničkoj praksi (Brackman & Coenye, 2015; Maura et al., 2016; D'Angelo et al., 2018). Do sada je literaturno potvrđeno da među

analiziranim QQ enzimima, PvdQ acilaza poreklom iz *P. aeruginosa* ne ostvaruje citotoksičan efekat na ćelije plućnog epitela, te predstavlja dobrog kandidata za razvoj antivirulentnih lekova (Utari et al., 2018). Pokazano je takođe da nanočestice srebra obložene AiiA laktonazom (prvim okarakterisanim QQ enzimom poreklom iz *Bacillus* sp. 240B1) ostvaruju znatno manji citotoksičan efekat na ćelije makrofaga u odnosu na sam enzim (Gupta & Chhibber, 2019). Imajući ovo u vidu, od velike važnosti je bilo da ispitamo da li *B. cepacia* BCC4135 rekombinantne laktonaze poseduju najznačajnije svojstvo u medicinskoj primeni - odsustvo citotoksičnosti na ćelije čoveka. Kako YtnP i Y2-aiiA nisu ostvarili statistički značajan citotoksični efekat na ćelijsku liniju HaCaT humanih keratinocita, ovi enzimi predstavljaju dobre kandidate za potencijalnu primenu u kliničkoj praksi.

Bitno je naglasiti da *B. cepacia* BCC4135 takođe poseduje QS mašineriju. Sposobnost *B. cepacia* da preživi u veoma heterogenim uslovima životne sredine može se delom pripisati međućelijskoj komunikaciji (Parke & Gurian-Sherman, 2001). QS sistem posredstvom AHL signalnih molekula kod ovog patogena igra centralnu ulogu u regulaciji virulencije i drugih fenotipskih svojstava kao što su kolonizacija i invazija niše. Fenotipski eseji, transkripcione i proteinske analize pokazali su da AHL-posredovan QS sistem *Burkholderia* vrsta kontroliše veći broj funkcija uključujući pokretljivost, formiranje biofilma i produkciju faktora virulencije kao što su proteaze, siderofore, toksini i antifungalna jedinjenja (Suppiger et al., 2013). Globalni QS sistem CepI/R kontroliše virulenciju infekcija izazvanih Bck vrstama kod nekoliko eukariotskih model sistema uključujući *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Galleria mellonella*, pacova i miša (Slinger et al., 2019; Sokol et al., 2003; Chapalain et al., 2013; Vergunst et al., 2010; Uehlinger et al., 2009). Rezultati naše studije pokazali su da *B. cepacia* BCC4135 koristi CepI/R (AnoI/R) QS sistem koji je visoko konzervisan među Bck vrstama pokazujući identičnost od preko 90% na aminokiselinskom nivou (Venturi et al., 2004). Najveći nivo ekspresije gena koji kodira AHL sintazu (*anoI*) i transkripcioni regulator (*anoR*) uočen je tokom 12-og sata kultivacije i odgovara stacionarnoj fazi rasta bakterijske kulture (Venturi et al., 2004). Dobijeni rezultati u skladu su sa nivoom ekspresije gena koji kodira intracelularnu laktonazu YtnP i njenom promotorskom aktivnošću, što snažno podržava postulaciju da ovaj enzim igra ulogu u autoregulaciji AHL-posredovanog QS sistema soja *B. cepacia* BCC4135. Već je pokazano da je fino regulisana koncentracija AHL molekula postignuta aktivnošću AHL acilaze kod *P. aeruginosa* (Sio et al., 2006), dok *A. tumefaciens* koristi višekomponentnu QS mrežu kako bi modulisao AHL-zavisne ćelijske procese (Zhang et al., 2002). Imajući u vidu da je sposobnost čišćenja i recikliranja sopstvenih QS signalnih molekula kod QS-emitujućih organizama već opisana kod brojnih bakterijskih vrsta uključujući *Shewanella*, *A. baumannii*, *Pseudoalteromonas byunsanensi* i *Brucella melitensis* (Tait et al., 2009; Mayer et al., 2018; Huang et al., 2012; Terwagne et al., 2013), ovaj fenomen bi mogao biti opšte prihvaćeni mehanizam za samokontrolu QS sistema. Iako fiziološka uloga YtnP laktonaze kod *B. cepacia* BCC4135 nije u potpunosti definisana, buduća istraživanja je neophodno usmeriti ka proučavanju uloge QQ aktivnosti u kontroli QS regulatorne kaskade ovog soja. Takođe, iznalaženje novih puteva aktivacije rane QS degradacije blokiranjem QS zavisne ekspresije faktora virulencije i njima srodnih gena trebalo bi da budu u fokusu budućih istraživanja.

Sumirano, u okviru ovog istraživanja funkcionalno su okarakterisane YtnP i Y2-aiiA laktonaze poreklom iz kliničkog izolata *B. cepacia* BCC4135 i utvrđena je njihova sposobnost da interferiraju sa QS sistemom *P. aeruginosa* kroz inhibitorno delovanje na proces formiranja biofilma i produkciju faktora virulencije ovog patogena. Pored toga, razlike u supstratnoj specifičnosti ukazuju na različitu biološku ulogu ova dva enzima. Takođe, pretpostavljamo da je uloga intracelularne YtnP laktonaze u autoregulaciji sopstvenog QS sistema soja BCC4135, dok bi ekstracelularna laktonaza Y2-aiiA mogla

imati ulogu u utišavanju međucelijske komunikacije bakterija među kompetitorima unutar iste niše. Iako smo ovom studijom otvorili nova pitanja kojima bi se trebalo pozabaviti u budućnosti, ovo istraživanje nedvosmisleno ukazuje na potencijal *B. cepacia* laktonaza usmeren ka *P. aeruginosa* kroz utišavanje njegovog QS sistema.

### 5.3. Biološka uloga i terapijski potencijal bioaktivnih QSI i QQ molekula poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135

Rezultati ove studije doprineli su sagledavanju kompleksnih odnosa unutar polimikrobne zajednice patogenih bakterija kroz kompetitivnu strategiju utišavanja međucelijske komunikacije i potencijalnu iskoristivost ove strategije u terapijske svrhe. Ustanovljeno je, naime, da mikroorganizmi koji dele istu ekološku nišu modulišu svoje ponašanje kao odgovor na intraspecijsku komunikaciju svojih kompetitora posredstvom ometanja njihove međucelijske komunikacije. Imajući u vidu da je *quorum quenching* relativno redak fenomen u prirodi (Torres et al., 2019), te činjenicu da je u okviru ovog istraživanja konstatovano prisutvo QQ fenotipa kod 19 od 633 testiranih izolata, ukazuje na uspešnost pristupa baziranog na bakterijama kompetitorima kao značajnom izvoru QQ molekula. Sumiranjem podataka iznesenih u ovoj tezi, može se zaključiti da klinički izolati predstavljaju veoma značajan izvor molekula utišivača međucelijske komunikacije bakterija.

Pored toga, značaj ove studije ogleda se u činjenici da je utišavanje QS sistema vrste *P. aeruginosa* postignuto AHL signalnim molekulima dugog lanca poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304, pri čemu bi se mogla napraviti analogija sa utišavanjem QS sistema *C. violaceum* CV026. Takođe, po prvi put identifikovana je nova AHL vrsta - dihidroksi-C18-HSL iz uzorka biološkog porekla.

Drugi važan segment ovog istraživanja odnosi se na utvrđivanje potencijalno nove biološke uloge YtnP i Y2-aiiA laktonaza poreklom iz *B. cepacia* BCC4135 bazirane na različitoj supstratnoj specifičnosti ovih enzima, činjenici da je transkripcija gena koji kodiraju ove QQ enzime precizno regulisana kroz faze rasta bakterijske kulture, kao i razlikama u AHL molekulima koje proizvode vrste pripadnici Bck i *P. aeruginosa*. Stoga je moguće govoriti o postojanju autoregulacije QQ/QS mreže soja BCC4135 kroz različitu ekspresiju i aktivnost YtnP i/ili Y2-aiiA laktonaza.

Zatim, detaljna karakterizacija bioaktivnih molekula poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 sojeva na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83 kliničkog izolata ukazuje na mogući terapijski potencijal QSI i QQ molekula, i doprinosi ideji da ovi molekuli mogu biti potencijalni kandidati u antivirulentnoj terapiji.

**Zaključci**

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj tezi, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Inicijalnom pretragom kolekcije Gram-negativnih kliničkih izolata Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju na prisustvo fenotipa utišavanja međucelijske komunikacije bakterija (QQ fenotipa), ustanovljena je zastupljenost ovog fenomena kod 19 izolata pripadnika 5 rodova, od ukupno 633 analizirana izolata, što ukazuje na uspešnost pristupa baziranog na bakterijama kompetitorima kao značajnom izvoru QQ molekula. Najznačajnija QQ aktivnost uočena je kod izolata *Delftia* sp. 11304 i *Burkholderia* sp. BCC4135, koji su potom detaljnije okarakterisani u ovom istraživanju. Kod BCC4135 izolata detektovano je prisustvo i *quorum sensing* (QS) fenomena.
2. Produkcija QQ molekula uslovljena je fazom rasta bakterijske kulture kod oba analizirana izolata. Takođe, ista zavisnost postoji u slučaju produkcije QS molekula kod *Burkholderia* sp. BCC4135.
3. *Delftia* sp. 11304 identifikovana je kao *Delftia tsuruhatensis*, dok je *Burkholderia* sp. BCC4135 pripadnik vrste *Burkholderia cepacia*. Pored toga, MLST genotipizacijom utvrđeno je da *B. cepacia* BCC4135 odlikuje novi jedinstven sekvencni tip ST1485.
4. *In silico* analiza celokupnih genomskih sekvenci sojeva *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 pokazala je da oba klinička izolata imaju značajan rezistentni i virulentni potencijal, ukazujući na svojstvo adaptacije ovih sojeva na bolničku sredinu i domaćina.
5. Biogeni utišivači međucelijske komunikacije bakterija analizirani u ovoj studiji su različite prirode, budući da *D. tsuruhatensis* 11304 produkuje inhibitore *quorum sensing* sistema (QSI) neproteinske prirode, dok *B. cepacia* BCC4135 produkuje QQ enzime.
6. Etil-acetatni ekstrakt supernatanta soja *D. tsuruhatensis* 11304 (QSI ekstrakt) pokazao je obećavajuća antivirulentna svojstva na model sistemu *P. aeruginosa* MMA83:
  - 6a. QSI ekstrakt sprečava formiranje biofilma, ali ne i dekompoziciju formiranog biofilma, što je najverovatnije posledica nepropustljivosti matriksa biofilma za aktivne komponente ekstrakta ili može ukazivati na drugačiji mehanizam delovanja QSI ekstrakta na QS sistem *P. aeruginosa* MMA83.
  - 6b. Smanjenje produkcije ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, piocijanina i ramnolipida primenom QSI ekstrakta ostvareno je na dozno-zavisan način.



- 6c. Osetljivost MDR kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 na meropenem i gentamicin povećana je kroz sinergističko delovanje QSI ekstrakta sa primenjenim antibioticima, što ukazuje da bi aktivne komponente iz ekstrakta mogle imati primenu u kombinovanoj terapiji.
- 6d. QSI ekstrakt ostvaruje izuzetan uticaj na smanjenje ekspresije gena koji kodiraju autoinducer sintazu i transkripcioni aktivator sva tri analizirana QS sistema *P. aeruginosa* - *las*, *rhl* i *pqs*, ukazujući na mogući antagonistički mehanizam delovanja bioaktivnih molekula poreklom iz QSI ekstrakta.
- 6e. MALDI MS instrumentalnom metodom utvrđen je sastav ukupnog *D. tsuruhatensis* 11304 QSI etil-acetatnog ekstrakta koga čine AHL dugog acilnog lanca od C12 do C18 atoma. Najdominantnije zastupljen bio je N-oktadekanoil homoserin lakton (C18-HSL), a ustanovljeno je prisustvo i dihidroksi-N-oktadekanoil homoserin laktone (dihidroksi-C18-HSL), molekula koji je u okviru ove studije prvi put identifikovan iz uzorka biološkog porekla.
- 6f. Komercijalni C18-HSL ispoljio je potencijal u smanjenju produkcije piocijanina kao i ekspresije *lasI* gena *P. aeruginosa* MMA83. Međutim, efekat komercijalnog C18-HSL bio je slabiji u poređenju sa ukupnim *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstraktom, što ukazuje da je anti-QS efekat posledica združene aktivnosti većeg broja aktivnih molekula poreklom iz QSI ekstrakta.
7. QQ enzimi YtnP i Y2-*aiiA* poreklom iz *B. cepacia* BCC4135 izolata pripadaju superfamiliji metalo- $\beta$ -laktamaza i poseduju HXHXDH cink-vezujući motiv u aktivnom mestu kao i aspartat i histidin neophodne za degradaciju N-acil-homoserin laktone (AHL).
8. YtnP i Y2-*aiiA* laktonaze dele oko 40% identičnosti aminokiselinske sekvence sa filogenetski najrodnijim AHL laktonazama, što potvrđuje visok diverzitet ove grupe enzima. Pore toga, ove laktonaze međusobno dele identičnost od 37% i grupisane su kao pripadnici YtnP klade. Budući da je predikcionom analizom ustanovljeno da Y2-*aiiA* laktonaza poseduje signalnu sekvencu na N-terminusu, pretpostavlja se da je u pitanju ekstracelularni enzim. Dodatno, iako postoje deponovane sekvence pretpostavljenih QQ laktonaza poreklom iz *Burkholderia* vrsta, one su po prvi put eksprimirane i eksperimentalno potvrđene u okviru ove studije.
9. U pogledu dužine bočnog acilnog lanca AHL, obe laktonaze imaju širok spektar supstratne specifičnosti za AHL molekule. YtnP enzim pokazao je veći afinitet za AHL kratkih i srednje dugih acilnih lanaca, dok je Y2-*aiiA* ispoljio efikasnost u degradaciji AHL kako kratkih tako i dugih acilnih lanaca, ostvarivši veću specifičnost za AHL dugog lanca. S obzirom da jedino ekstracelularna laktonaza Y2-*aiiA* vrši degradaciju N-tetradekanoil homoserin laktone (C14-HSL), upućuje na postojanje razlike u biološkoj ulozi ovih enzima sa stanovišta autoregulacije QS sistema soja BCC4135 i interferencije sa QS sistemima bakterija sa kojima dele istu ekološku nišu.
10. Ustanovljena je zavisnost  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti promotora *ytnP* i *y2-aiiA* laktonaznih gena od faze rasta bakterijske kulture, pri čemu je maksimalna aktivnost promotorskih fuzija utvrđena u različitim fazama rasta, što ponovo ukazuje na njihovu različitu biološku ulogu. Ovakav zaključak dodatno je podržan praćenjem nivoa iRNK *ytnP* i *y2-aiiA* gena.

11. YtnP i Y2-aiiA laktonaze ostvaruju značajan anti-QS potencijal na model sistema kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83:
  - 11a. Oba enzima ispoljila su inhibitorno dejstvo na proces formiranja biofilma bez uticaja na preživljavanje ćelija. Ekstracelularna laktonaza Y2-aiiA poseduje veću sposobnost sprečavanja formiranja biofilma, što je u skladu sa većom supstratnom specifičnošću ove laktonaze za AHL signalne molekule odgovorne za formiranje biofilma vrste *P. aeruginosa*.
  - 11b. YtnP i Y2-aiiA laktonaze utiču na smanjenje produkcije ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, piocijanina i ramnolipida vrste *P. aeruginosa*.
  - 11c. Osim uticaja na *las* i *rhl* puteve odgovorne za sintezu faktora virulencije i formiranje biofilma, YtnP i Y2-aiiA utišavaju i *pqs* QS mrežu *P. aeruginosa*, što je po prvi put zabeleženo među QQ laktonazama. Kombinacija enzima imala je značajniji efekat na utišavanje QS sistema u odnosu na primenu svakog od enzima pojedinačno. Takođe, Y2-aiiA laktonaza bila je efikasnija u smanjenju ekspresije svih analiziranih gena uključenih u QS sistem *P. aeruginosa* MMA83.
12. YtnP i Y2-aiiA enzimi ne ostvaruju citotoksičan efekat na ćelijsku liniju HaCaT humanih keratinocita, što ih čini potencijalnim kandidatima za primenu u kliničkoj praksi.
13. *B. cepacia* BCC4135 koristi globalnu regulatornu QS mrežu CepI/R (AnoI/R) visoko konzervisano među Bcc vrstama za upravljanje sopstvenim virulentnim potencijalom i verovatno vrši autoregulaciju QQ/QS mreže kroz različitu ekspresiju i aktivnost YtnP i/ili Y2-aiiA laktonaza.

**Literatura**

## 7. LITERATURA

1. Aguilar, C., Friscina, A., Devescovi, G., Kojic, M., & Venturi, V. (2003). Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *Journal of bacteriology*, 185(21), 6456-6462. <https://doi.org/10.1128/jb.185.21.6456-6462.2003>
2. Alipour, M., Suntres, Z.E., Lafrenie, R.M., & Omri, A. (2010). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4.1), 684-693. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq036>
3. Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37, 420-423. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z
4. Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., & Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71(0), 78-91. doi: 10.5604/01.3001.0010.3792
5. Arashida, N., Shimbo, K., Terada, T., Okimi, T., Kikuchi, Y., Hashiro, S., Umekage, S., & Yasueda, H. (2018). Identification of novel long chain *N*-acylhomoserine lactones of chain length C<sub>20</sub> from the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(10), 1683-1693. doi: 10.1080/09168451.2018.1490168
6. Arzanlou, M., Chai, W.C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 49-59. doi: 10.1042/EBC20160063
7. Asif, M., & Imran, M. (2019). Quorum Sensing Inhibition: Current Advances of the Natural Antimicrobial Agents. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 45, 488-504 doi: 10.1134/S1068162019060049
8. Azam, M.W., & Khan, A.U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359. doi: 10.1016/j.drudis.2018.07.003
9. Azevedo, A.S., Almeida, C., Pereira, B., Melo, L.F., & Azevedo, N.F. (2016). Impact of *Delftia tsuruhatensis* and *Achromobacter xylosoxidans* on *Escherichia coli* dual-species biofilms treated with antibiotic agents. *Biofouling*, 32(3), 227-241. doi: 10.1080/08927014.2015.1124096
10. Bahari, S., Zeighami, H., Mirshahabi, H., Roudashti, S., & Haghi, F. (2017). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 21-28. doi: 10.1016/j.jgar.2017.03.006

11. Baldelli, V., D'Angelo, F., Pavoncello, V., Fiscarelli, E., V., Visca, P., Rampioni, G., & Leoni, L. (2020). Identification of FDA-approved antivirulence drugs targeting the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing effector protein PqsE, *Virulence*, 11(1), 652-668. doi: 10.1080/21505594.2020.1770508
12. Banerji, R., Kanojiya, P., & Saroj, S.D. (2020). Role of interspecies bacterial communication in the virulence of pathogenic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(2), 136-146. doi: 10.1080/1040841X.2020.1735991
13. Barraud, N., Kelso, M.J., Rice, S.A., & Kjelleberg, S. (2015). Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 31-42. doi: 10.2174/1381612820666140905112822
14. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7, 212527. doi: 10.7573/dic.212527
15. Bassler, B.L., & Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell*, 125, 237-246.
16. Bautista-Hernández, D., Ramírez-Burgos, L., Duran-Páramo E., & Fernández-Linares, L. (2012). Zinc and Lead Biosorption by *Delftia tsuruhatensis*: A Bacterial Strain Resistant to Metals Isolated from Mine Tailings. *Journal of Water Resource and Protection*, 4(4), 207-216. doi: 10.4236/jwarp.2012.44023
17. Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., Daudé, D., Chabrière, E., & Elias, M. (2018). Structural and Biochemical Characterization of AaL, a Quorum Quenching Lactonase with Unusual Kinetic Properties. *Scientific reports*, 8(1), 11262. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28988-5>
18. Bernier, S.P., Workentine, M.L., Li, X., Magarvey, N.A., O'Toole, G.A., & Surette, M.G. (2016). Cyanide Toxicity to *Burkholderia cenocepacia* Is Modulated by Polymicrobial Communities and Environmental Factors. *Frontiers in microbiology*, 7, 725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00725>
19. Bianchi, S.M., Prince, L.R., McPhillips, K., Allen, L., Marriott, H.M., Taylor, G.W., Hellewell, P.G., Sabroe, I., Dockrell, D.H., Henson, P.W., & Whyte, M.K. (2008). Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(1), 35-43. doi: 10.1164/rccm.200612-1804OC
20. Bijtenhoorn, P., Mayerhofer, H., Müller-Dieckmann, J., Utpatel, C., Schipper, C., Hornung, C., Szesny, M., Grond, S., Thürmer, A., Brzuszkiewicz, E., Daniel, R., Dierking, K., Schulenburg, H., & Streit, W.R. (2011). A novel metagenomic short-chain dehydrogenase /reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 6(10), e26278. doi: 10.1371/journal.pone.0026278
21. Bobadilla Fazzini, R.A., Skindersoe, M.E., Bielecki, P., Puchałka, J., Givskov, M., & Martins dos Santos, V.A. (2013). Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response. *Environmental Microbiology*, 15(1), 111-120. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02792.x

22. Borges, A., & Simões, M. (2019). Quorum Sensing Inhibition by Marine Bacteria. *Marine drugs*, 17(7), 427. <https://doi.org/10.3390/md17070427>
23. Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J., & Coenye, T. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 2655-2661. <https://doi.org/10.1128/AAC.00045-11>
24. Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 5-11. doi: 10.2174/1381612820666140905114627
25. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
26. Bragonzi, A., Farulla, I., Paroni, M., Twomey, K.B., Pirone, L., Lorè, N.I., Bianconi, I., Dalmastrì, C., Ryan, R.P., & Bevivino, A. (2012). Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PloS one*, 7(12), e52330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052330>
27. Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R., & Häussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Journal of bacteriology*, 187(11), 3630-3635. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3630-3635.2005>
28. Breidenstein, E.B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R.E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419-426. doi: 10.1016/j.tim.2011.04.005
29. Bressler, A.M., Kaye, K.S., LiPuma, J.J., Alexander, B.D., Moore, C.M., Reller, L.B., & Woods, C.W. (2007). Risk factors for *Burkholderia cepacia* complex bacteremia among intensive care unit patients without cystic fibrosis: a case-control study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 28(8), 951-958. doi: 10.1086/519177
30. Brint, J.M., & Ohman, D.E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of bacteriology*, 177(24), 7155-7163. <https://doi.org/10.1128/jb.177.24.7155-7163.1995>
31. Buhl, M., Peter, S., & Willmann, M. (2015). Prevalence and risk factors associated with colonization and infection of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(9), 1159-1170. doi: 10.1586/14787210.2015.1064310
32. Bzdrenga, J., Daudé, D., Rémy, B., Jacquet, P., Plener, L., Elias, M., & Chabrière, E. (2017). Biotechnological applications of quorum quenching enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 104-115. doi: 10.1016/j.cbi.2016.05.028
33. Cai, X., Yu, M., Shan, H., Tian, X., Zheng, Y., Xue, C., & Zhang, X.H. (2018). Characterization of a Novel N-Acylhomoserine Lactonase RmmL from *Ruegeria mobilis* YJ3. *Marine drugs*, 16(10), 370. <https://doi.org/10.3390/md16100370>

34. Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., & Rahme, L.G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14613-14618. <https://doi.org/10.1073/pnas.251465298>
35. Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E.A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S.J., Wood, T.K., & García-Contreras, R. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World journal of clinical cases*, 3(7), 575-598. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575>
36. Chan, K.G., Atkinson, S., Mathee, K., Sam, C.K., Chhabra, S.R., Cámara, M., Koh, C.L., & Williams, P. (2011). Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC microbiology*, 11, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-51>
37. Chan, K.G., Yin, W.F., & Hong, K.W. (2016). Recent Advances in Bacterial Quorum Quenching. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, 2, 1206-1220. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch117>
38. Chan, K.G., Liu, Y.C., & Chang, C.Y. (2015). Inhibiting N-acyl-homoserine lactone synthesis and quenching *Pseudomonas* quinolone quorum sensing to attenuate virulence. *Frontiers in microbiology*, 6, 1173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01173>
39. Chang, H., Zhou, J., Zhu, X., Yu, S., Chen, L., Jin, H., & Cai, Z. (2017). Strain identification and quorum sensing inhibition characterization of marine-derived *Rhizobium* sp. NAO1. *Royal Society open science*, 4(3), 170025. <https://doi.org/10.1098/rsos.170025>
40. Chapalain, A., Vial, L., Laprade, N., Dekimpe, V., Perreault, J., & Déziel, E. (2013). Identification of quorum sensing-controlled genes in *Burkholderia ambifaria*. *MicrobiologyOpen*, 2(2), 226-242. <https://doi.org/10.1002/mbo3.67>
41. Chatterjee, P., Davis, E., Yu, F., James, S., Wildschutte, J.H., Wiegmann, D.D., Sherman, D.H., McKay, R.M., LiPuma, J.J., & Wildschutte, H. (2016). Environmental pseudomonads inhibit cystic fibrosis patient-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, 1-16. doi: 10.1128/AEM.02701-16
42. Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17477-17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>
43. Chen, G., Swem, L.R., Swem, D.L., Stauff, D.L., O'Loughlin, C.T., Jeffrey, P.D., Bassler, B. L., & Hughson, F.M. (2011). A strategy for antagonizing quorum sensing. *Molecular cell*, 42(2), 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003>

44. Cho, H.S., Lee, J.H., Ryu, S.Y., Joo, S.W., Cho, M.H., & Lee, J. (2013). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by plant metabolite  $\epsilon$ -viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(29), 7120-7126. doi: 10.1021/jf4009313
45. Choi, Y., Park, H. Y., Park, S. J., Park, S. J., Kim, S. K., Ha, C., Im, S. J., & Lee, J. H. (2011). Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules and cells*, 32(1), 57-65. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6>
46. Chowdhary, P.K, Keshavan, N., Nguyen, H.Q., Peterson, J.A., González, J.E., & Haines, D.C. (2007). *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*, 46(50), 14429-14437. doi: 10.1021/bi701945j
47. Christensen, Q.H., Grove, T.L., Booker, S.J., & Greenberg, E.P. (2013). A high-throughput screen for quorum-sensing inhibitors that target acyl-homoserine lactone synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 13815-13820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313098110>
48. Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J., Kim, H., Igarashi, J., Suga, H., Moon, J. S., Hwang, I., & Rhee, S. (2011). Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(29), 12089-12094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103165108>
49. Chrzanowski, L., Lawniczak, L., & Czaczyk, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 401-419. doi: 10.1007/s11274-011-0854-8
50. Churchill, M.E., & Chen, L. (2011). Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. *Chemical Reviews*, 111(1), 68-85. doi: 10.1021/cr1000817
51. Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., & Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 607-626. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00113.x
52. Costello, A., Reen, F.J., O'Gara, F., Callaghan, M., & McClean, S. (2014). Inhibition of co-colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. *Microbiology*, 160(7), 1474-1487. doi: 10.1099/mic.0.074203-0
53. Costerton, J.W., Geesey, G.G., & Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95. doi: 10.1038/scientificamerican0178-86
54. Coutinho, H.D., Falcão-Silva, V.S., & Gonçalves, G.F. (2008). Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *International archives of medicine*, 1(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1755-7682-1-24>
55. Crone, S., Vives-Florez, M., Kvich, L., Saunders, A.M., Malone, M., Nicolaisen, M.H., Martinez-Garcia, E., Rojas-Acosta, C., Catalina Gomez-Puerto, M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R., & Bjarnsholt, T. (2019). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, 128(3), 220-231. doi: 10.1111/apm.13010



56. D'Angelo, F., Baldelli, V., Halliday, N., Pantalone, P., Polticelli, F., Fiscarelli, E., Williams, P., Visca, P., Leoni, L., & Rampioni, G. (2018). Identification of FDA-Approved drugs as antivirulence agents targeting the pqs quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62, e01296-18. doi: 10.1128/AAC.01296-18
57. Dales, L., Ferris, W., Vandemheen, K., & Aaron, S.D. (2009). Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(10), 1275-1279. doi: 10.1007/s10096-009-0774-9
58. Dang, S., Hong, T., Bu, D., Tang, J., Fan, J., & Zhang, W. (2012). Optimized refolding and characterization of active C-terminal ADAMTS-18 fragment from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(1):32-36. doi: 10.1016/j.pep.2011.11.009
59. Das, T., Ibugo, A.I., Klare, W., & Manefield, M. (2016). Role of pyocyanin and extracellular DNA in facilitating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, p 23-42. Dhanasekaran D. (ed), *Microbial biofilms: importance and applications*. IntechOpen, London, United Kingdom.
60. Davey, M.E., Caiazza, N.C., & O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 185(3), 1027-1036. <https://doi.org/10.1128/jb.185.3.1027-1036>
61. De Kievit, T.R., & Iglewski, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and immunity*, 68(9), 4839-4849. doi: 10.1128/iai.68.9.4839-4849.2000
62. De Kievit, T.R., Kakai, Y., Register, J.K., Pesci, E.C., & Iglewski, B.H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 101-106. doi: 10.1016/s0378-1097(02)00735-8
63. De Kievit, T.R. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 11(2), 279-288. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x
64. Deep, A., Chaudhary, U., & Gupta, V. (2011). Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. *Journal of laboratory physicians*, 3(1), 4-11. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.78553>
65. De Oliveira, D.M.P., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L., & Walker, M.J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19
66. Deziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lepine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., & Rahme, L.G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-l-homoserine lactones. *Molecular Microbiology*, 55, 998-1014. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04448.x
67. Dietrich, L.E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D.K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of

- Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1308-1321. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x
68. Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., Kong, X., Hider, R.C., Cornelis, P., Cámara, M., & Williams, P. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry & Biology*, 14, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014>
69. Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Cámara, M., & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology*, 50(1), 29-43. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03672.x
70. Ding, X., Yin, B., Qian, L., Zeng, Z., Yang, Z., Li, H., Lu, Y., & Zhou, S. (2011). Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Medical Microbiology*, 60(12), 1827-1834. doi: 10.1099/jmm.0.024166-0
71. Disz, T., Akhter, S., Cuevas, D., Olson, R., Overbeek, R., Vonstein, V., Stevens, R., & Edwards, R.A. (2010). Accessing the SEED genome databases via Web services API: tools for programmers. *BMC bioinformatics*, 11, 319. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-319>
72. Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., & Zhang, L.H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3526-3531. <https://doi.org/10.1073/pnas.060023897>
73. Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., & Zhang, L.H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 411(6839), 813-817. doi: 10.1038/35081101
74. Dong, W., Zhu, J., Guo, X., Kong, D., Zhang, Q., Zhou, Y., Liu, X., Zhao, S., & Ruan, Z. (2018). Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huakui* LAM0618<sup>T</sup> and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Scientific Reports*, 8, 6013. doi: 10.1038/s41598-018-24507-8
75. Donlan R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
76. Duan, K., & Surette, M. G. (2007). Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *Journal of bacteriology*, 189(13), 4827-4836. <https://doi.org/10.1128/JB.00043-07>
77. Dusane, D.H., Zinjarde, S.S., Venugopalan, V.P., McLean, R.J., Weber, M.M., & Rahman, P.K. (2010). Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 27, 159-184. doi: 10.1080/02648725.2010.10648149

78. Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., & Oppenheimer, N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20, 2444-2449.
79. Eberl, L., & Tümmler, B. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3), 123-131. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.022
80. El-Shaer, S., Shaaban, M., Barwa, R., & Hassan, R. (2016). Control of quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* using phenylalanine arginyl  $\beta$ -naphthylamide. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10), 1194-1204. doi: 10.1099/jmm.0.000327
81. Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., & Crawford, I.P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of bacteriology*, 172(2), 884-900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>
82. Fan, X., Liang, M., Wang, L., Chen, R., Li, H., & Liu, X. (2017). Aii810, a Novel Cold-Adapted N-Acylhomoserine Lactonase Discovered in a Metagenome, Can Strongly Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors and Biofilm Formation. *Frontiers in microbiology*, 8, 1950. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01950>
83. Feige, M.J., Braakman, I., & Hendershot, L.M. (2018). CHAPTER 1.1: Disulfide Bonds in Protein Folding and Stability. *Oxidative Folding of Proteins: Basic Principles, Cellular Regulation and Engineering*, pp. 1-33. doi: 10.1039/9781788013253-00001. eISBN: 978-1-78801-325-3
84. Fernandes, P., & Martens, E. (2017). Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology*, 133, 152-163. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>
85. Fetzner, S. (2015). Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology*, 201, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.001>
86. Figurski, D.H., & Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1648-1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
87. Filiatrault, M.J., Picardo, K.F., Ngai, H., Passador, L., & Iglewski, B.H. (2006). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infection and immunity*, 74(7), 4237-4245. <https://doi.org/10.1128/IAI.02014-05>
88. Flemming, H.C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology*, 8, 623-633. doi: 10.1038/nrmicro2415
89. Fong, J., Zhang, C., Yang, R., Boo, Z.Z., Tan, S.K., Nielsen, T.E., Givskov, M., Liu, X.W., Bin, W., & Su, H. (2018). Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of *P. aeruginosa*. *Scientific Reports*, 8, 1155. doi: 10.1038/s41598-018-19504-w

90. Frank, D.N., Wilson, S.S., St Amand, A.L., & Pace, N.R. (2009). Culture-independent microbiological analysis of foley urinary catheter biofilms. *PloS one*, 4(11), e7811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007811>
91. Fuqua, C., Parsek, M.R., & Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35, 439-468. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913
92. Furiga, A., Lajoie, B., El Hage, S., Baziard, G., & Roques, C. (2015). Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New Quorum-Sensing Inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), 1676-1686. <https://doi.org/10.1128/AAC.02533-15>
93. Gambello, M.J., Kaye, S., & Iglewski, B.H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and immunity*, 61(4), 1180-1184.
94. García-Contreras, R., Nuñez-López, L., Jasso-Chávez, R., Kwan, B.W., Belmont, J.A., Rangel-Vega, A., Maeda, T., & Wood, T.K. (2015). Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating. *The ISME journal*, 9(1), 115-125. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.98>
95. Gellatly, S.L., & Hancock, R.E.W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
96. Govan, J.R., Brown, A.R., & Jones, A.M. (2007). Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiology*, 2(2), 153-164. doi: 10.2217/17460913.2.2.153
97. Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 86-116. doi: 10.1093/femsre/fuv038
98. Grönlund, H., Bergman, T., Sandstrom, K., Alvelius, G., Reininger, R., Verdino, P., Hauswirth, A., Liderot, K., Valent, P., Spitzauer, S., Keller, W., Valenta, R., & van Hage-Hamsten, M. (2003). Formation of disulfide bonds and homodimers of the major cat allergen Fel d 1 equivalent to the natural allergen by expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 40144-51. doi: 10.1074/jbc.M301416200
99. Gould, T.A., Schweizer, H.P., & Churchill, M.E. (2004). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Molecular Microbiology*, 53(4), 1135-1146. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04211.x
100. Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Rémy, B., Elias, M., Lavigne, J.P., Daudé, D., & Chabrière, E. (2017). Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. *Frontiers in microbiology*, 8, 227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00227>

101. Guo, H., Yang, Y., Liu, K., Xu, W., Gao, J., Duan, H., Du, B., Ding, Y., & Wang, C. (2016). Comparative Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* MTQ3 and the Identification of Functional NRPS Genes for Siderophore Production. *BioMed Research International*, 3687619, 8. <https://doi.org/10.1155/2016/3687619>
102. Guo, J., Yoshida, K., Ikegame, M., & Okamura, H. (2020). Quorum sensing molecule N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone : An all-rounder in mammalian cell modification. *Journal of Oral Biosciences*, 62(1), 16-29. <https://doi.org/10.1016/j.job.2020.01.001>
103. Guo-Xiang, Li., Shu-Yi-Dan, Zhou., Hong-Yun, Ren., Xi-Mei, Xue., Yao-Yang, Xu., & Peng, Bao. (2018). Extracellular Biomineralization of Gold by *Delftia tsuruhatensis* GX-3 Isolated from a Heavy Metal Contaminated Paddy Soil. *ACS Earth and Space Chemistry* 2(12), 1294-1300. doi: 10.1021/acsearthspacechem.8b00127
104. Gupta, K., & Chhibber, S. (2019). Biofunctionalization of Silver Nanoparticles With Lactonase Leads to Altered Antimicrobial and Cytotoxic Properties. *Frontiers in molecular biosciences*, 6, 63. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00063>
105. Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M.J., Arora, D., & Grant, G.D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
106. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology*, 2(2), 95-108. doi: 10.1038/nrmicro821
107. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. doi: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8
108. Hanahan, D. (1985). *DNA Cloning* (Glover, D.M., ed) IRL Press, Oxford, 1, 109.
109. Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Yang, H., Wang, Y., & Song, W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1), 66-76. doi: 10.1016/j.syapm.2004.09.003
110. Hattemer, A., Hauser, A., Diaz, M., Scheetz, M., Shah, N., Allen, J.P., Porhomayon, J., & El-Solh, A.A. (2013). Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8), 3969-3975. <https://doi.org/10.1128/AAC.02467-12>
111. Hänsch, G.M., Prior, B., Brenner-Weiss, G., Obst, U., & Overhage, J. (2014). The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 12, 21-26. doi: 10.5301/jabfm.5000204
112. Hebber, K.P., Martel, M.H., & Heulin, T. (1998). Suppression of pre- and post-emergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 29-36.

113. Heras, B., Scanlon, M.J., & Martin, J.L. (2015). Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *British journal of clinical pharmacology*, 79(2), 208-215. <https://doi.org/10.1111/bcp.12356>
114. Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, K.M., Smith, C.P., Ward, J.M., & Schrempf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
115. Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., & Nickerson, K.W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2982-2992. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001>
116. Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., & Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*, 3(2), 55-65. doi: 10.4248/IJOS11026
117. Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., & Leadbetter, J.R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology*, 69(10), 5941-5949. <https://doi.org/10.1128/aem.69.10.5941-5949.2003>
118. Huang, W., Lin, Y., Yi, S., Liu, P., Shen, J., Shao, Z., & Liu, Z. (2012). QsdH, a novel AHL lactonase in the RND-type inner membrane of marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* strain 1A01261. *PloS one*, 7(10), e46587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046587>
119. Hunter, R.C., Klepac-Ceraj, V., Lorenzi, M.M., Grotzinger, H., Martin, T.R., & Newman, D.K. (2012). Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(6), 738-745. doi: 10.1165/rcmb.2012-0088OC
120. Hutchings, M.I., Truman, A.W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008
121. Jakobsen, T.H., Bragason, S.K., Phipps, R.K., Christensen, L.D., van Gennip, M., Alhede, M., Skindersoe, M., Larsen, T.O., Høiby, N., Bjarnsholt, T., & Givskov, M. (2012). Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 78(7), 2410-2421. <https://doi.org/10.1128/AEM.05992-11>
122. Jensen, P.Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T., & Moser, C. (2010). The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 292-305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x>
123. Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*, 15. <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>

124. Jiang, Y., Geng, M., & Bai, L. (2020) Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms*, 8(8), 1222. doi: 10.3390/microorganisms8081222
125. 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>
126. Juan, C., Peña, C., & Oliver, A. (2017). Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Infectious Diseases*, 215(1), S44-S51. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>
127. Juárez-Jiménez, B., Manzanera, M., Rodelas, B., Martínez-Toledo, M.V., Gonzalez-López, J., Crognale, S., Pesciaroli, C., & Fenice, M. (2010). Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation*, 21(3), 475-489. doi: 10.1007/s10532-009-9317-4
128. Kalia, V.C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224-245. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004
129. Kaplan, H.B., & Greenberg, E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of bacteriology*, 163(3), 1210-1214.
130. Kaplan, J.B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-18. doi: 10.1177/0022034509359403
131. Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Mee, J.M., Altobell, L.J., 3rd, Kujawa, D.P., Jeffries, E., Clapham, B., Meijler, M.M., & Janda, K.D. (2006). Antibody interference with N-acyl homoserine lactone-mediated bacterial quorum sensing. *Journal of the American Chemical Society*, 128(9), 2802-2803. <https://doi.org/10.1021/ja0578698>
132. Kim, C., Heseck, D., Lee, M., & Mobashery, S. (2018). Potentiation of the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics by farnesol and its derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 28(4), 642-645. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.028>
133. Kim, S., & Lee, J. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 54(2), 71-85. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5528-7>
134. Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., & Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Frontiers in microbiology*, 2, 150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>
135. Koh, C.L., Sam, C.K., Yin, W.F., Tan, L.Y., Krishnan, T., Chong, Y.M., & Chan, K.G. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(5), 6217-6228. <https://doi.org/10.3390/s130506217>

136. Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B.E., Jeffries, J.L., Ohman, D.E., & Lau, G.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PloS one*, 6(11), e27091. doi: 10.1371/journal.pone.0027091
137. Kumar, R.S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A.V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., & Sakthivel, N. (2005). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 145-154. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02435.x
138. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
139. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
140. LaBauve, A.E., & Wargo, M.J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, Chapter 6, Unit-6E.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
141. LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews*, 77(1), 73-111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12
142. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
143. Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599-606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
144. Leadbetter, J.R., & Greenberg, E.P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of bacteriology*, 182(24), 6921-6926. <https://doi.org/10.1128/jb.182.24.6921-6926.2000>
145. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., & Zhang, L.H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 339-343. doi: 10.1038/nchembio.1225
146. Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*, 6(1), 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
147. Lee, K., & Yoon, S.S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1053-1064. doi: 10.4014/jmb.1611.11056
148. Leid, J.G. (2009). Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe*, 4, 66-70.



149. Leipert, J., Treitz, C., Leippe, M. & Tholey, A. (2017). Identification and Quantification of N-Acyl Homoserine Lactones Involved in Bacterial Communication by Small-Scale Synthesis of Internal Standards and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(12), 2538-2547. doi: 10.1007/s13361-017-1777-x
150. Leitão, J.H., Sousa, S.A., Ferreira, A.S., Ramos, C.G., Silva, I.N., & Moreira, L.M. (2010). Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 31-40. doi: 10.1007/s00253-010-2528-0
151. Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 58995. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698
152. Li, S., Chen, S., Fan, J., Cao, Z., Ouyang, W., Tong, N., Hu, X., Hu, J., Li, P., Feng, Z., Huang, X., Li, Y., Xie, M., He, R., Jian, J., Wu, B., Xu, C., Wu, W., Guo, J., Lin, J., & Sun, P. (2018). Antibiofilm effect of novel thiazole acid analogs against *Pseudomonas aeruginosa* through IQS pathways. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, 64-73. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.076
153. Li, X.C., Wang, C., & Mulchandani, A., & Ge, X. (2016). Engineering Soluble Human Paraoxonase 2 for Quorum Quenching. *ACS Chemical Biology*, 11(11), 3122-3131. doi: 10.1021/acscchembio.6b00527
154. Li, X., Quan, C.S., & Fan, S.D. (2007). Antifungal activity of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against plant pathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 508-514. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02221.x
155. Limoli, D.H., Jones, C.J., & Wozniak, D.J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology spectrum*, 3(3), doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014
156. Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., & Zhang, L.H. (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*, 47(3), 849-860. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x
157. Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., & Martinez, J.L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19484-19489.
158. Lister, P.D., Wolter, D.J., & Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582-610. doi: 10.1128/CMR.00040-09
159. Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic acids research*, 47(1), D687-D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>

160. Liu, D., Thomas, P.W., Momb, J., Hoang, Q.Q., Petsko, G.A., Ringe, D., & Fast, W. (2007). Structure and specificity of a quorum-quenching lactonase (AiiB) from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry*, 46(42), 11789-11799. doi: 10.1021/bi7012849
161. Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*, 25 (4), 402-408.
162. Mah, T.F., & O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34-39. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2
163. Maharaj, S., Isache, C., Seegobin, K., Chang, S., & Nelson, G. (2017). Necrotizing *Pseudomonas aeruginosa* Community-Acquired Pneumonia: A Case Report and Review of the Literature. *Case reports in infectious diseases*, 1717492. doi: 10.1155/2017/1717492
164. 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>
165. Malladi, V.L., Sobczak, A.J., Meyer, T.M., Pei, D., & Wnuk, S.F. (2011). Inhibition of LuxS by S-ribosylhomocysteine analogues containing a [4-aza]ribose ring. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(18), 5507-5519. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.043>
166. Manefield, M., & Turner, S.L. (2002). Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology*, 148(12), 3762-3764. doi: 10.1099/00221287-148-12-3762
167. Marketon, M.M., Gronquist, M.R., Eberhard, A., & González, J.E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *Journal of bacteriology*, 184(20), 5686-5695. doi: 10.1128/jb.184.20.5686-5695.2002
168. Marx, C., Gardner, S., Harman, R.M., & Van de Walle, G.R. (2020). The mesenchymal stromal cell secretome impairs methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms via cysteine protease activity in the equine model. *Stem Cells Translational Medicine*, 1-12. doi: 10.1002/sctm.19-0333.
169. Masák, J., Čejková, A., Schreiberová, O., & Režanka, T. (2014). *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 1-14. doi: 10.1111/1574-6941.12344
170. Massai F., Imperi, F., Quattrucci, S., Zennaro, E., Visca, P., & Leoni, L. (2011). A multitask biosensor for micro-volumetric detection of *N*-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone quorum sensing signal. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(8), 3444-3449. doi: 10.1016/j.bios.2011.01.022
171. Maura, D., Ballok, A.E., & Rahme, L.G. (2016). Considerations and caveats in anti-virulence drug development. *Current opinion in microbiology*, 33, 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.001>

172. Mayer, C., Muras, A., Romero, M., López, M., Tomás, M., & Otero, A. (2018). Multiple Quorum Quenching Enzymes Are Active in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 310. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00310>
173. McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., ... & Wright, G.D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 3348-3357. doi: 10.1128/AAC.00419-13
174. McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143, 3703-3711.
175. McDaniel, C.T., Panmanee, W., & Hassett, D.J. (2015). An overview of infections in cystic fibrosis airways and the role of environmental conditions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and viability. *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*, ed D.Wat (InTech), 171-198.
176. McDonough, K.A., & Rodriguez, A. (2011). The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nature reviews Microbiology*, 10(1), 27-38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2688>
177. McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., & Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature reviews Microbiology*, 10(1), 39-50. doi: 10.1038/nrmicro2695
178. McInnis, C.E., & Blackwell, H.E. (2011). Thiolactone modulators of quorum sensing revealed through library design and screening. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(16), 4820-4828. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.071>
179. Mei, G.Y., Yan, X.X., Turak, A., Luo, Z.Q., & Zhang, L.Q. (2010). AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 4933-4942. <https://doi.org/10.1128/AEM.00477-10>
180. Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: NY.
181. Miller, M.B., & Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199.
182. Montgomery, K., Charlesworth, J.C., LeBard, R., Visscher, P.T., & Burns, B.P. (2013). Quorum sensing in extreme environments. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(1), 131-148. <https://doi.org/10.3390/life3010131>

183. Moradali, M.F., Ghods, S., & Rehm, B.H.A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(2). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
184. Morales, D.K., Jacobs, N.J., Rajamani, S., Krishnamurthy, M., Cubillos-Ruiz, J.R., & Hogan, D.A. (2010). Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Molecular microbiology*, 78(6), 1379-1392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07414.x>
185. Moré, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., & Winans, S.C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, 272(5268), 1655-1658. doi: 10.1126/science.272.5268.1655
186. Morin, D., Grasland, B., Vallée-Réhel, K., Dufau, C. & Haras, D. (2003). On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 1002, 79-92. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00730-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00730-1)
187. Mühlen, S., & Dersch, (2016). P. Anti-virulence Strategies to Target Bacterial Infections. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 147-183. doi: 10.1007/82\_2015\_490
188. Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S., & Pardesi, K.R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
189. Munita, J.M., & Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
190. Muñoz-Cazares, N., García-Contreras, R., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M., & Castillo-Juárez, I. (2018). Natural Products With Quorum Quenching-Independent Antivirulence Properties. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 327-351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00010-7>
191. Murugayah, S.A., & Gerth, M.L. (2019). Engineering quorum quenching enzymes: progress and perspectives. *Biochemical Society transactions*, 47(3), 793-800. <https://doi.org/10.1042/BST20180165>
192. Müsken, M., Di Fiore, S., Dötsch, A., Fischer, R., & Häussler, S. (2010). Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. *Microbiology*, 156(2), 431-441. doi: 10.1099/mic.0.033290-0
193. Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., & Quax, W.J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46-65. doi: 10.1128/mmbr.05007-11
194. Nagahara, N. (2011). Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch. *Amino Acids*, 41(1), 59-72. doi: 10.1007/s00726-010-0508-4

195. Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., & Menon, V. (2014). Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial resistance and infection control*, 3(1), 32. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-32>
196. Neelson, K.H., Platt, T., & Hastings, J.W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104, 313-322.
197. Neelson, K.H., & Hastings, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiology Reviews*, 43, 496-518.
198. Ng, W.L., & Bassler, B.L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43, 197-222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
199. Nguyen, D.H., Nguyen, D.T.M., & Kim, E.K. (2008). Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from laboratory equipments. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(5), 1136-1139. <https://doi.org/10.1007/s11814-008-0186-z>
200. Nguyen, A.T., & Oglesby-Sherrouse, A.G. (2016). Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during co-cultivations and polymicrobial infections. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(14), 6141-6148. doi: 10.1007/s00253-016-7596-3
201. Nithya, C., Begum, M.F., & Pandian, S.K. (2010). Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1), 341-358. doi: 10.1007/s00253-010-2777-y
202. Nithya C., Devi, M.G., & Karutha Pandian, S. (2011). A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling*, 27(5), 519-528. doi: 10.1080/08927014.2011.586127
203. Novik, G., Savich, V., & Kiseleva, E. (2015). An insight into beneficial *Pseudomonas* bacteria. *Microbiology in Agriculture and Human Health*, (Europe: InTech), 73-105. doi: 10.5772/60502
204. O'Brien, S., & Fothergill, J.L. (2017). The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS microbiology letters*, 364(15), fnx128. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx128>
205. Ochsner, U. A., & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6424-6428. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6424>
206. Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
207. Oglesby, A. G., Farrow, J. M., 3rd, Lee, J. H., Tomaras, A. P., Greenberg, E. P., Pesci, E. C., & Vasil, M. L. (2008). The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *The Journal of biological chemistry*, 283(23), 15558-15567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707840200>

208. Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21-22, 41-59. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.002
209. Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 877-886. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z
210. Ono, K., Oka, R., Toyofuku, M., Sakaguchi, A., Hamada, M., Yoshida, S., & Nomura, N. (2014). cAMP signaling affects irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbes and environments*, 29(1), 104-106. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13151>
211. O'Toole, G.A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28, 449-461. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
212. Palleroni, N.J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1377-1383. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x
213. Pamp, S.J., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2531-2539. <https://doi.org/10.1128/JB.01515-06>
214. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
215. Park, J., Jagasia, R., Kaufmann, G.F., Mathison, J.C., Ruiz, D.I., Moss, J.A., Meijler, M.M., Ulevitch, R.J., & Janda, K.D. (2007). Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chemistry & biology*, 14(10), 1119-1127. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.08.013
216. Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K., Oh, J.W., Koo, B.T., Yum, D.Y., & Lee, J. K. (2003). AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, 149(6), 1541-1550. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26269-0>
217. Parke, J.L., & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 225-258. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.225
218. Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., & Greenberg, E.P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 197-201. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.197>
219. Pearson, J.P., Van Delden, C., & Iglewski, B.H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1203-1210.

220. Peng, Y., Leung, H.C., Yiu, S.M., & Chin, F.Y. (2012). IDBA-UD: a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11), 14208. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>.
221. Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., & Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11229-11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>
222. Pessi, G., & Haas, D. (2000). Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 182(24), 6940-6949. <https://doi.org/10.1128/jb.182.24.6940-6949.2000>
223. Petrova, O.E., & Sauer, K. (2012). Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of bacteriology*, 194(10), 2413-2425. doi: 10.1128/JB.00003-12
224. Pinjari, A.B., Pandey, J.P., Kamireddy, S., & Siddavattam, D. (2013). Expression and subcellular localization of organophosphate hydrolase in acephate-degrading *Pseudomonas* sp. strain Ind01 and its use as a potential biocatalyst for elimination of organophosphate insecticides. *Letters in Applied Microbiology*, 57(1), 63-68. doi: 10.1111/lam.12080
225. Pustelný, C., Albers, A., Buldt-Karentzopoulos, K., Parschat, K., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., & Fetzner, S. (2009). Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*, 16(12), 1259-1267. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.11.013
226. Preiswerk, B., Ullrich, S., Speich, R., Bloemberg, G.V., & Hombach, M. (2011). Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), 246-248. doi: 10.1099/jmm.0.021238-0
227. Prina, E., Ranzani, O.T., Polverino, E., Cilloniz, C., Ferrer, M., Fernandez, L., Puig de la Bellacasa, J, Men ´endez R, Mensa J, & Torres A. (2015). Risk factors associated with potentially antibiotic-resistant pathogens in community acquired pneumonia. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(2), 153-160. doi: 10.1513/AnnalsATS.201407-305OC
228. Rampioni, G., Pustelný, C., Fletcher, M. P., Wright, V. J., Bruce, M., Rumbaugh, K. P., Heeb, S., Cámara, M., & Williams, P. (2010). Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environmental microbiology*, 12(6), 1659-1673. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02214.x>
229. Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., Zennaro, E., & Leoni, L. (2007). RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 66(6), 1557-1565. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06029.x

230. Ranc, A., Dubourg, G., Fournier, P.E., Raoult, D., & Fenollar, F. (2018). *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. *Emerging infectious diseases*, 24(3), 594-596. <https://doi.org/10.3201/eid2403.160939>
231. Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 759348. doi: 10.1155/2015/759348
232. Reid, A.M., Brougham, C.A., Fogarty, A.M., & Roche, J.J. (2007). An investigation into possible sources of phthalate contamination in the environmental analytical laboratory. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87(2), 125-133. <https://doi.org/10.1080/03067310601071183>
233. Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., & Daudé, D. (2018). Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Frontiers in pharmacology*, 9, 203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>
234. Rezzoagli, C., Archetti, M., Mignot, I., Baumgartner, M., & Kümmerli, R. (2019). Combining antibiotics with antivirulence compounds can have synergistic effects and reverse selection for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv* 861799. doi: <https://doi.org/10.1101/861799>
235. Rienzo, D.D., Kamalanathan, M. & Martin, P. (2016). Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry*, 51(7), 820-827, doi: 10.1016/j.procbio.2016.04.007
236. Rusmana, I., Asmarany, A., & Wahyudi, A.T. (2017). Cloning and expression of acyl homoserine lactone (AHL) lactonase genes of *Bacillus cereus* INT1c and *Bacillus thuringiensis* SGT3g in *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 16(38), 1895-1901. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16200>
237. Russotto, V., Cortegiani, A., Raineri, S.M., & Giarratano, A. (2015). Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care*, 3, 54. doi: 10.1186/s40560-015-0120-5
238. Rutherford, S.T., & Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427
239. Ryan, R.P., & Dow, J.M. (2008). Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, 154(7), 1845-1858. doi: 10.1099/mic.0.2008/017871-0
240. Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W., & Prince, A.S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209-1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>



241. Saha, S., Thavasi, R. & Jayalakshami, S. (2008). Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Research Journal of Microbiology*, 3(3), 122-128. <https://doi.org/10.3923/jm.2008.122.128>
242. Saurav, K., Costantino, V., Venturi, V., & Steindler, L. (2017). Quorum Sensing Inhibitors from the Sea Discovered Using Bacterial N-acyl-homoserine Lactone-Based Biosensors. *Marine drugs*, 15(3), 53. <https://doi.org/10.3390/md15030053>
243. Schauder, S., & Bassler, B.L. (2001). The languages of bacteria. *Genes & Development*, 15(12), 1468-1480. doi: 10.1101/gad.899601
244. Schafhauser, J., Lepine, F., McKay, G., Ahlgren, H. G., Khakimova, M., & Nguyen, D. (2014). The stringent response modulates 4-hydroxy-2-alkylquinoline biosynthesis and quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 196(9), 1641-1650. <https://doi.org/10.1128/JB.01086-13>
245. Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., & Greenberg, E.P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 51, 973-985.
246. Schuster, M., & Greenberg, E.P. (2006). A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 73-81. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.036
247. Schuster, M., & Greenberg, E.P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC genomics*, 8, 287. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-287>
248. Schwab, U., Abdullah, L.H., Perlmutter, O.S., Albert, D., Davis, C.W., Arnold, R.R., Yankaskas, J.R., Gilligan, P., Neubauer, H., Randell, S.H., & Boucher, R.C. (2014). Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucus. *Infection and immunity*, 82(11), 4729-4745. <https://doi.org/10.1128/IAI.01876-14>
249. Seed, P.C., Passador, L., & Iglewski, B.H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of bacteriology*, 177(3), 654-659. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.654-659.1995>
250. Seo, M.J., Lee, B.S., Pyun, Y.R., & Park, H. (2011). Isolation and characterization of N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus caldoxylosilyticus* YS-8. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 75(9), 1789-1795. <https://doi.org/10.1271/bbb.110322>
251. Sharma, D., Misba, L., & Khan, A.U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>

252. Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, 42(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>
253. Sheludchenko, M.S., Kolomytseva, M.P., Travkin, V.M., Akimov, V.N., & Golovleva, L.A. (2005). Degradation of Aniline by *Delftia tsuruhatensis* 14S in Batch and Continuous Processes. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 41(5), 530-534.
254. Shi, Q., Huang, C., Xiao, T., Wu, Z., & Xiao, Y. (2019). A retrospective analysis of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: prevalence, risk factors, and outcome in carbapenem-susceptible and -non-susceptible infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 68. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0520-8>
255. Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S., & Kida, K. (2003). *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1479-1483. doi: 10.1099/ijs.0.02285-0
256. Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., & Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652-680. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x
257. Singh, V.K., Kavita, K., Prabhakaran, R., & Jha, B. (2013). Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling*, 29(7), 855-867. doi: 10.1080/08927014.2013.807914
258. Singh, V.K., Mishra, A., & Jha, B. (2017). Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity of *Delftia tsuruhatensis* Extract by Attenuating the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 337. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00337>
259. Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P., & Quax, W.J. (2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and immunity*, 74(3), 1673-1682. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1673-1682.2006>
260. Slinger, B.L., Deay, J.J., Chandler, J.R., & Blackwell, H.E. (2019). Potent modulation of the CepR quorum sensing receptor and virulence in a *Burkholderia cepacia* complex member using non-native lactone ligands. *Scientific Reports*, 9, 13449. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49693-x>
261. Smalley, N.E., An, D., Parsek, M.R., Chandler, J.R., & Dandekar, A.A. (2015). Quorum Sensing Protects *Pseudomonas aeruginosa* against Cheating by Other Species in a Laboratory Coculture Model. *Journal of bacteriology*, 197(19), 3154-3159. doi: 10.1128/JB.00482-15
262. Sokol, P.A., Sajjan, U., Visser, M.B., Gingues, S., Forstner, J., & Kooi, C. (2003). The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology*, 149(12), 3649-3658. doi: 10.1099/mic.0.26540-0

263. Sokol, P.A., Malott, R., Riedel, K., & Eberl, L. (2007). Communication systems in the genus *Burkholderia*: global regulators and targets for novel antipathogenic drugs. *Future Microbiology*, 2(5), 555-563. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.5.555>
264. Solano, C., Echeverez, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008
265. Soukarieh, F., Williams, P., Stocks, M.J., & Cámara, M. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(23), 10385-10402. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00540
266. Sousa, S.A., Ramos, C.G., & Leitão, J.H. (2011). *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *International journal of microbiology*, 2011, 607575. <https://doi.org/10.1155/2011/607575>
267. Spaink, H.P., Okker, R.J., Wijffelman, C.A., Pees, E., & Lugtenberg, B.J. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology*, 9(1), 27-39. doi: 10.1007/BF00017984
268. Stachel, S.E., An, G., Flores, C., & Nester, E.W. (1985). A Tn3 lacZ transposon for the random generation of beta-galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. *The EMBO journal*, 4(4), 891-898. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03715.x>
269. Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115, 891-899. [10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
270. Storz, M.P., Maurer, C.K., Zimmer, C., Wagner, N., Brengel, C., de Jong, J.C., Lucas, S., Müsken, M., Häussler, S., Steinbach, A., & Hartmann, R.W. (2012). Validation of PqsD as an anti-biofilm target in *Pseudomonas aeruginosa* by development of small-molecule inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 134(39), 16143-16146. doi: 10.1021/ja3072397
271. Suppiger, A., Schmid, N., Aguilar, C., Pessi, G., & Eberl, L. (2013). Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence*, 4(5), 400-409. <https://doi.org/10.4161/viru.25338>
272. Swem, L.R., Swem, D.L., O'Loughlin, C.T., Gatmaitan, R., Zhao, B., Ulrich, S.M., & Bassler, B.L. (2009). A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Molecular cell*, 35(2), 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.029>
273. Tabak, O., Mete, B., Aydin, S., Mandel, N.M., Otlu, B., Ozaras, R., & Tabak, F. (2013). Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. *New Microbiologica*, 36(2), 199-201.

274. Tait, K., Williamson, H., Atkinson, S., Williams, P., Cámara, M., & Joint, I. (2009). Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signalling. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1792-1802. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01904.x
275. Tan, L.Y., Yin, W.F., & Chan, K.G. (2012). Silencing quorum sensing through extracts of *Melicope lunu-ankenda*. *Sensors* (Basel, Switzerland), 12(4), 4339-4351. <https://doi.org/10.3390/s120404339>
276. Tang, K., Su, Y., Brackman, G., Cui, F., Zhang, Y., Shi, X., Coenye, T., & Zhang, X.H. (2015). MomL, a novel marine-derived N-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. *Applied and environmental microbiology*, 1(2), 774-782. doi: 10.1128/AEM.02805-14
277. Teasdale, M.E., Donovan, K.A., Forscher-Dancause, S.R., & Rowley, D.C. (2011). Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of quorum sensing inhibitors. *Marine Biotechnology*, (NY). 13(4), 722-732. doi: 10.1007/s10126-010-9334-7
278. Tedesco, P., Visone, M., Parrilli, E., Tutino, M.L., Perrin, E., Maida, I., Fani, R., Ballestriero, F., Santos, R., Pinilla, C., Di Schiavi, E., Tegos, G., & de Pascale, D. (2015). Investigating the Role of the Host Multidrug Resistance Associated Protein Transporter Family in *Burkholderia cepacia* Complex Pathogenicity Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. *PloS one*, 10(11), e0142883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142883>
279. Tejman-Yarden, N., Robinson, A., Davidov, Y., Shulman, A., Varvak, A., Reyes, F., Rahav, G., & Nissan, I. (2019). Delftibactin-A, a Non-ribosomal Peptide With Broad Antimicrobial Activity. *Frontiers in microbiology*, 10, 2377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02377>
280. Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X., & Letesson, J.J. (2013). Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PloS one*, 8(12), e82514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082514>
281. Tettmann, B., Niewerth, C., Kirschhöfer, F., Neidig, A., Dötsch, A., Brenner-Weiss, G., Fetzner, S., & Overhage, J. (2016). Enzyme-Mediated Quenching of the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Promotes Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* by Increasing Iron Availability. *Frontiers in microbiology*, 7, 1978. doi: 10.3389/fmicb.2016.01978
282. Theodora, N.A., Dominika, V., & Waturangi, D.E. (2019). Screening and quantification of anti-quorum sensing and antibiofilm activities of phyllosphere bacteria against biofilm forming bacteria. *BMC Research Notes*, 12, 732. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4775-1>
283. Thiel, V., Kunze, B., Verma, P., Wagner-Döbler, I., & Schulz, S. (2009). New structural variants of homoserine lactones in bacteria. *Chembiochem*, 10(11), 1861-1868. doi: 10.1002/cbic.200900126
284. Thomas, P.W., Stone, E.M., Costello, A.L., Tierney DL, & Fast W. (2005). The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry*, 44(20), 7559-7569. doi: 10.1021/bi050050m

285. Torres, M., Dessaux, Y., & Llamas, I. (2019). Saline Environments as a Source of Potential Quorum Sensing Disruptors to Control Bacterial Infections: A Review. *Marine drugs*, 17(3), 191. <https://doi.org/10.3390/md17030191>
286. Torres, M., Uroz, S., Salto, R., Fauchery, L., Quesada, E., & Llamas, I. (2017). HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. *Scientific reports*, 7(1), 943. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01176-7>
287. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 7-12. doi: 10.1080/09168451.2015.1058701
288. Trivedi, M.K., Patil, S., Shettigar, H., Gangwar, M., & Jana, S. (2015). An effect of biofield treatment on multidrug-resistant *Burkholderia cepacia*: a multihost pathogen. *Journal of Tropical Diseases*, 3(3). <https://doi.org/10.4172/2329-891x.1000167>
289. Tümmler B. (2019). Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1371. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19509.1>
290. Uehlinger, S., Schwager, S., Bernier, S.P., Riedel, K., Nguyen, D.T., Sokol, P.A., & Eberl, L. (2009). Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infection and immunity*, 77(9), 4102-4110. <https://doi.org/10.1128/IAI.00398-09>
291. Upadhyay, V., Singh, A., Jha, D., Singh, A., & Panda, A.K. (2016). Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microbial cell factories*, 15, 100. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0504-9>
292. Uroz, S., Dessaux, Y., & Oger, P. (2009). Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem*, 10(2), 205-216. doi: 10.1002/cbic.200800521
293. Utari, P.D., Setroikromo, R., Melgert, B.N., & Quax, W.J. (2018). PvdQ Quorum Quenching Acylase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in a Mouse Model of Pulmonary Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 119. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00119>
294. Vadekeetil, A., Saini, H., Chhibber, S., & Harjai, K. (2016). Exploiting the antivirulence efficacy of an ajoene-ciprofloxacin combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm associated murine acute pyelonephritis. *Biofouling*, 32(4), 371-382. doi: 10.1080/08927014.2015.1137289
295. Van Delden, C. (2004). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, vol. 2. Kluwer Academic/Plenum, New York, N.Y.
296. Vasiljevic, Z., Novovic, K., Kojic, M., Minic, P., Sovtic, A., Djukic, S., & Jovicic, B. (2016). *Burkholderia cepacia* complex in Serbian patients with cystic fibrosis: prevalence and molecular epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(8), 1277-84. doi: 10.1007/s10096-016-2662-4

297. Vasireddy, L., Bingle, L., & Davies, M.S. (2018). Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. PloS one, 13(8), e0201835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201835>
298. Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. FEMS Microbiology Reviews, 30(2), 274-291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x>
299. Venturi, V., Friscina, A., Bertani, I., Devescovi, G., & Aguilar, C. (2004). Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. Research in Microbiology, 155(4), 238-244. doi: 10.1016/j.resmic.2004.01.006
300. Vial, L., Chapalain, A., Groleau, M.C., & Déziel, E. (2011). The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. Environmental Microbiology, 13(1), 1-12. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02343.x
301. Wang, W.Z., Morohoshi, T., Someya, N., & Ikeda, T. (2012). AidC, a novel N-acylhomoserine lactonase from the potato root-associated cytophaga-flavobacteria-bacteroides (CFB) group bacterium *Chryseobacterium* sp. strain StRB126. Applied and environmental microbiology, 78(22), 7985-7992. <https://doi.org/10.1128/AEM.02188-12>
302. Waryah, C.B., Wells, K., Ulluwishewa, D., Chen-Tan, N., Gogoi-Tiwari, J., Ravensdale, J., Costantino, P., Gokcen, A., Vilcinskas, A., Wiesner, J., & Mukkur, T. (2017). *In vitro* antimicrobial efficacy of tobramycin against *Staphylococcus aureus* biofilms in combination with or without DNase I and/or dispersin B: a preliminary investigation. Microbial Drug Resistance, 23(3), 384-390. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0100>
303. Waters, C.M., & Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 21, 319-346. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
304. Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., von Bodman, S.B., & Churchill, M.E. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. Molecular Cell, 9(3), 685-694. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00480-x
305. Welsh, M.A., & Blackwell, H.E. (2016). Chemical Genetics Reveals Environment-Specific Roles for Quorum Sensing Circuits in *Pseudomonas aeruginosa*. Cell chemical biology, 23(3), 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.006>
306. Vergunst, A.C., Meijer, A.H., Renshaw, S.A., & O'Callaghan, D. (2010). *Burkholderia cenocepacia* creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. Infection and immunity, 78(4), 1495-1508. <https://doi.org/10.1128/IAI.00743-09>
307. Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(24), 13904-13909. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13904>

308. Whiteley, M., & Greenberg, E.P. (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *Journal of bacteriology*, 183(19), 5529-5534. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5529-5534.2001>
309. Wilkins, M., Hall-Stoodley, L., Allan, R.N., & Faust, S.N. (2014). New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection*, 69 (1), S47-S52. doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.014
310. Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., & Flemming, H.C. (2001). Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology*, 336, 302-314. doi: 10.1016/s0076-6879(01)36597-7
311. Wohlgemuth, R., Littlechild, J., Monti, D., Schnorr, K., von Rossum, T., Siebers, B., Menzel, P., Kublanov, I.V., Gunn Rike, A., Skretas, G., Szabo, Z., Peng, X., & Young, M.J. (2018). Discovering novel hydrolases from hot environments. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2077-2100. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.004
312. Yan, H., Yang, X., Chen, J., Yin, C., Xiao, C., & Chen, H. (2011). Synergistic removal of aniline by carbon nanotubes and the enzymes of *Delftia* sp. XYJ6. *Journal of Environmental Sciences*, 23(7), 1165-1170. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60531-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60531-1)
313. Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., & Wang, X. (2011). Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PloS one*, 6(7), e22981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022981>
314. Yang, Y.X., Xu, Z.H., Zhang, Y.Q., Tian, J., Weng, L.X., & Wang, L.H. (2012). A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 50(6), 987-993. doi: 10.1007/s12275-012-2149-7
315. Yao, G.W., Duarte, I., Le, T.T., Carmody, L., LiPuma, J.J., Young, R., & Gonzalez, C.F. (2017). A Broad-Host-Range Tailocin from *Burkholderia cenocepacia*. *Applied and environmental microbiology*, 83(10), e03414-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03414-16>
316. Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H., & Williams, P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 70(10), 5635-5646. <https://doi.org/10.1128/iai.70.10.5635-5646.2002>
317. Yawata, Y., Nomura, N., & Uchiyama, H. (2008). Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5429-5435. <https://doi.org/10.1128/AEM.00801-08>
318. Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome

- 
- assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
319. Zhang, H.B., Wang, L.H., & Zhang, L.H. (2002). Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4638-4643. <https://doi.org/10.1073/pnas.022056699>
320. Zhang, J.W., Xuan, C.G., Lu, C.H., Guo, S., Yu, J.F., Asif, M., Jiang, W.J., Zhou, Z.G., Luo, Z.Q., & Zhang, L.Q. (2019). AidB, a novel thermostable N-acylhomoserine lactonase from the bacterium *Bosea* sp. *Applied and environmental microbiology*, 85(24), e02065-19. doi: 10.1128/AEM.02065-19
321. Zhang, X., Ou-Yang, S., Wang, J., Liao, L., Wu, R., & Wei., J. (2018). Construction of Antibacterial Surface Via Layer-by-Layer Method. *Current Pharmaceutical Design*, 24(8), 926-935. doi: 10.2174/1381612824666180219125655
322. Zhu, J., Beaber, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., & Winans, S.C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 180(20), 5398-5405.



**Prilozi**

## 8. PRILOZI

## Prilog 1.

U okviru ove studije analizirana su 633 klinička izolata svrstana u 11 različitih bakterijskih taksona iz kolekcije mikroorganizama Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

Takson	Broj testiranih izolata
<i>Acinetobacter</i> spp.	39
<i>Achromobacter</i> spp.	128
<i>Burkholderia cepacia</i> kompleks	218
<i>Delftia</i> spp.	2
<i>Klebsiella</i> spp.	27
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Chryseobacterium</i> spp.	38
<i>Ochrobactrum</i> spp.	5
<i>Ralstonia</i> spp.	26
<i>Pseudomonas</i> spp.	2
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	147

## Prilog 2.

Lista gena koji kodiraju faktore virulencije pronađenih u genomskoj sekvenci *D. tsuruhatensis* 11304 upotrebom VFDB platforme.

Faktor virulencije - klasa	Faktor virulencije	Gen	Pozicija u genomu
Adherencija	Pili tip IV	<i>pilB</i>	orf00087
		<i>pilD</i>	orf00185
		<i>pilC</i>	orf00184
		<i>pilT</i>	orf01535
		<i>pilZ</i>	orf04843
		<i>pilG</i>	orf00352
		<i>pilH</i>	orf00351
		<i>pilT2</i>	orf01537
	Hsp60	<i>htpB</i>	orf05068
	Polarna flagela	<i>flmH</i>	orf01106
Antifagocitoza	Kapsula I	<i>wcbR</i>	orf01334; orf01738

	Biosinteza alginata	<i>algC</i>	orf03101
		<i>algU</i>	orf01103
		<i>algW</i>	orf00215
Invazija	Flagela	<i>cheA</i>	orf02974
		<i>cheB</i>	orf02978
		<i>cheR</i>	orf02976
		<i>cheW</i>	orf02975; orf04956
		<i>cheY</i>	orf02924
		<i>flgC</i>	orf02949
		<i>flgE</i>	orf02947
		<i>flgG</i>	orf02945
		<i>flgI</i>	orf02943
		<i>flhA</i>	orf02921
		<i>fliA</i>	orf02918
		<i>fliF</i>	orf02955
		<i>FliG</i>	orf02956
		<i>FliI</i>	orf02958
		<i>FliM</i>	orf02963
		<i>FliN</i>	orf02964
		<i>FliP</i>	orf02966
		<i>FliQ</i>	orf02967
	<i>MotA</i>	orf02926	
Sistem za sekreciju	Bsa T3SS	<i>BprA</i>	orf02662
	T6SS-1	<i>ClpV</i>	orf00584; orf05910
	EPS sistem za sekreciju tip II	<i>EpsE</i>	orf00927; orf01946
	H-T6SS		orf04989
		<i>clpV1</i>	orf05001
	Lsp sistem za sekreciju tip II	<i>LspG</i>	orf01955
	TTSS	<i>hopANI</i>	orf02512
	T4SS		orf00602
		orf05792	
	T6SS-II	<i>ClpB</i>	orf01040
Rezistencija na kiselu sredinu	Ureaza	<i>UreB</i>	orf05362
		<i>UreG</i>	orf05367
Anaerobno disanje	Nitrat reduktaza	<i>NarH</i>	orf01482
Usvajanje bakra	Transport bakra	<i>CtpV</i>	orf01918
Efluks pumpa	AcrAB	<i>AcrB</i>	orf04575
	FarAB	<i>FarB</i>	orf03793
	MtrCDE	<i>MtrD</i>	orf01898; orf03504; orf05890
Usvajanje gvožđa	ABC transporter	<i>FagC</i>	orf04044
	Periplazmatski protein deo ABC sistema za transport	<i>VctC</i>	orf03026
	Ornibaktin	<i>OrbE</i>	orf06039

	Receptor za pioverdin	<i>FpvA</i>	orf00399
	Pioverdin	<i>PvdA</i>	orf01340
		<i>PvdE</i>	orf03836
		<i>PvdF</i>	orf03835
		<i>PvdY</i>	orf01341
	Siderofore	<i>BauE</i>	Orf01249
Metabolizam masti i masnih kiselina	Izocitrat lijaza	<i>Icl</i>	orf05741
	Sinteza pantotenata	<i>PanD</i>	orf01380
Usvajanje magnezijuma	Mg <sup>2+</sup> transport	<i>MgtB</i>	orf00859
Rezistencija na serum	LPS rfb lokus	<i>RmlD</i>	orf00902

### Prilog 3.

Lista genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike u genomskoj sekvenci *D. tsuruhatensis* 11304 ustanovljena upotrebom CARD baze podataka.

Gen	Determinanta rezistencije	Pozicija u genomu
<i>mexF</i>	RND efluks transporter	NOD_11
<i>amrB</i>	RND efluks transporter	NOD_14
<i>mexY</i>	MexY	NOD_14
<i>PA2018</i>	Efluks protein	NOD_14
<i>mexB</i>	RND efluks transporter	NOD_14
<i>mexD</i>	RND efluks transporter	NOD_37
<i>mexI</i>	RND efluks transporter	NOD_37
<i>mdtB</i>	Efluks sistem, subjedinica B	NOD_58
<i>smeE</i>	RND protein	NOD_63
<i>smeB</i>	SmeB	NOD_63
<i>srm(B)</i>	Rezistencija na spiramicin	NOD_75
<i>srmX</i>	Rezistencija na spiramicin	NOD_96
<i>srmR</i>	Rezistencija na spiramicin	NOD_96
<i>mexA</i>	RND efluks membranski protein	NOD_128
<i>bla-oxa258</i>	β-laktamaza OXA258	NOD_141
<i>blaLRA-13</i>	LRA-13	NOD_141

## Prilog 4.

Lista gena koji kodiraju faktore virulencije pronađenih u genomskoj sekvenci *B. cepacia* BCC4135 upotrebom VFDB javno dostupne baze podataka.

Faktor virulencije - klasa	Faktor virulencije	Gen	Pozicija u genomu
Adherencija	BoaA	<i>BoaA</i>	orf00308
	BoaB	<i>BoaB</i>	orf04018
	Pili tip IV	<i>PilA</i>	orf02980
		<i>PilB</i>	orf06868
		<i>PilC</i>	orf06869
		<i>PilD</i>	orf06870
Flp pili tip IV	<i>FlpF</i>	orf00197	
Antifagocitoza	Kapsula I	<i>ManC</i>	orf06248; orf08130
		<i>WcbA</i>	orf08129
		<i>WcbB</i>	orf08128
		<i>WcbC</i>	orf05255
		<i>WcbD</i>	orf05267
		<i>WcbE</i>	orf05256
		<i>WcbP</i>	orf05270
		<i>WcbQ</i>	orf05271
		<i>WcbR</i>	orf05272
		<i>WcbS</i>	orf05273
		<i>WcbT</i>	orf05274
		<i>Wzm</i>	orf05266
	Kapsularni polisaharid	<i>wbjD/wecB</i>	orf02283
Invazija	Flagela	<i>CheA</i>	orf01160
		<i>CheB</i>	orf01155
		<i>CheD</i>	orf01156
		<i>CheR</i>	orf01157
		<i>CheW</i>	orf01159
		<i>cheY1</i>	orf01161
		<i>CheY</i>	orf01154
		<i>CheZ</i>	orf01153
		<i>FlgA</i>	orf06426
		<i>FlgB</i>	orf06425
		<i>FlgC</i>	orf06424
		<i>FlgD</i>	orf06423
		<i>FlgE</i>	orf03829; orf06421
		<i>FlgF</i>	orf06420
		<i>FlgG</i>	orf06418
		<i>FlgH</i>	orf06417
		<i>FlgI</i>	orf06419
		<i>FlgJ</i>	orf06416
<i>FlgK</i>	orf06414		

		<i>FlgL</i>	orf06413
		<i>FlgM</i>	orf06427
		<i>FlgN</i>	orf06428
		<i>FlhA</i>	orf05124
		<i>FlhB</i>	orf05125
		<i>FlhF</i>	orf05123
		<i>FlhG</i>	orf05122
		<i>FlgH</i>	orf06417
		<i>FlgI</i>	orf06419
		<i>FlgJ</i>	orf06416
		<i>FlgK</i>	orf06414
		<i>FlgL</i>	orf06413
		<i>FlhA</i>	orf05124
		<i>FlhB</i>	orf05125
		<i>FlhF</i>	orf05123
		<i>FliS</i>	orf07049
		<i>FliM</i>	orf01303
		<i>FliO</i>	orf01305
		<i>FliP</i>	orf01306
		<i>FliA</i>	orf05121
		<i>FliC</i>	orf01176
		<i>FliD</i>	orf00684; orf01177
		<i>FliE</i>	orf07048
		<i>FliF</i>	orf07047
		<i>FliG</i>	orf07046
		<i>FliI</i>	orf07045
		<i>FliJ</i>	orf07044
		<i>FliK</i>	orf07043
		<i>FliL</i>	orf01302
		<i>FliM</i>	orf01303
		<i>FliN</i>	orf01304
		<i>FliO</i>	orf01305
		<i>FliP</i>	orf01306
		<i>FliQ</i>	orf01307
		<i>FliR</i>	orf01308
		<i>FliS</i>	orf07049
		<i>MotA</i>	orf01163; orf02481
		<i>MotB</i>	orf01162
		<i>Tsr</i>	orf00330; orf00416; orf00738; orf00961; orf01158; orf03460; orf04231; orf07912
	QS sistem	<i>pmlI/bspI1</i>	orf06956
		<i>pmlR/bspR1</i>	orf06954
Sistem za sekreciju	Bsa T3SS	<i>BprA</i>	orf00133; orf00798
	AAI/SCI-II T6SS	<i>AaiB</i>	orf02774

	Lsp sistem za sekreciju tip II	<i>LspG</i>	orf05387
	T6SS-II		orf02009
	T6SS		orf05210
		<i>Hcp</i>	orf00306; orf02457; orf08052
	VAS sistem za sekreciju tip VI	<i>VasG</i>	orf05208
Formiranje biofilma	AdeFGH efluks pumpa	<i>AdeG</i>	orf00724; orf05146
Kolonizacija domaćina	Sinteza kapsula i transport		orf00432
Efluks pumpe	AcrAB	<i>AcrB</i>	orf07569
	FarAB	<i>FarB</i>	orf01296
	MtrCDE	<i>MtrD</i>	orf01343
Endotoksin	LOS	<i>KdsA</i>	orf00143
		<i>KpsF</i>	orf00140
Usvajanje gvožđa	Piohijelin	<i>PchA</i>	orf00608
		<i>PchB</i>	orf00607
		<i>PchC</i>	orf00606
		<i>PchD</i>	orf00605
		<i>PchE</i>	orf00603
		<i>PchF</i>	orf00602
		<i>PchG</i>	orf00601
		<i>PchH</i>	orf00600
		<i>PchI</i>	orf00599
		<i>PchR</i>	orf00604
	Pioverdin	<i>PvdF</i>	orf05728
Adaptacija na stres	Katalaza	<i>KatA</i>	orf03485
Toksin	Alfa-hemolizin	<i>HlyB</i>	orf06534

## Prilog 5.

Lista genetičkih determinanti rezistencije na antibiotike u genomskoj sekvenci *B. cepacia* BCC4135 ustanovljena upotrebom CARD baze podataka.

Naziv gena	Determinanta rezistencije	Pozicija u genomu
<i>ramA</i>	RND efluks transporter	NOD_1
<i>adeL</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>omp38</i>	Porin	NOD_1
<i>tet(48)</i>	Ribozomski protein koji determiniše rezistenciju na tetraciklin	NOD_1
<i>AIM-1</i>	AIM $\beta$ laktamaza	NOD_1
<i>opcM</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>farA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_1
<i>emrY</i>	MFS efluks pumpa	NOD_1
<i>macB</i>	ABC efluks pumpa	NOD_1
<i>mexJ</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>mexK</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>oprZ</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>nalD</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>evgS</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>apmA</i>	Amp acetiltransferaza	NOD_1
<i>bcr-1</i>	MFS efluks pumpa	NOD_1
<i>mtrA</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>pmrF</i>	Pmr fosfoetanolamin transferaza	NOD_1
<i>facT</i>	MFS efluks pumpa	NOD_1
<i>smeS</i>	RND efluks pumpa	NOD_1
<i>qepA4</i>	MFS efluks pumpa	NOD_1
<i>nmcR</i>	NmcA $\beta$ -laktamaza	NOD_1
<i>qacA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_1
<i>oleC</i>	ABC efluks pumpa	NOD_1
<i>basS</i>	Pmr fosfoetanolamin transferaza	NOD_2
<i>smeR</i>	RND efluks pumpa	NOD_2
<i>cpxA</i>	RND efluks pumpa	NOD_2
<i>evgA</i>	RND efluks pumpa	NOD_2
<i>arnA</i>	Pmr fosfoetanolamin transferaza	NOD_2
<i>Ugd</i>	Pmr fosfoetanolamin transferaza	NOD_2
<i>smeF</i>	RND efluks pumpa	NOD_2
<i>lfrA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_2
<i>vanC</i>	Van ligaza	NOD_2
<i>cmrA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_2



<i>novA</i>	ABC efluks pumpa	NOD_2
<i>mexG</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>oprN</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>adeF</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>oqxA</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>golS</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>tetX</i>	Tetraciklin inaktivacioni enzim	NOD_3
<i>vanRO</i>	Rezistencija na glikopeptid; vanR	NOD_3
<i>opmB</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>muxA</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>mexI</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>smeD</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>muxC</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>gadX</i>	RND efluks pumpa	NOD_3
<i>kdpE</i>	KdpDE	NOD_3
<i>vatF</i>	Streptogramin <i>vat</i> acetiltransferaza	NOD_5
<i>basR</i>	Pmr fosfoetanolamin transferaza	NOD_5
<i>emrB</i>	MFS efluks pumpa	NOD_5
<i>adeA</i>	RND efluks pumpa	NOD_6
<i>adeB</i>	RND efluks pumpa	NOD_6
<i>adeR</i>	RND efluks pumpa	NOD_6
<i>baeS</i>	RND efluks pumpa	NOD_6
<i>bcrA</i>	ABC efluks pumpa	NOD_6
<i>mdtN</i>	MFS efluks pumpa	NOD_6
<i>norA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_6
<i>Iri</i>	Rifampicin monooksigenaza	NOD_6
<i>mepR</i>	MATE (eng. <i>multidrug and toxic compound extrusion</i> ) transporter	NOD_7
<i>rosB</i>	MFS efluks pumpa	NOD_7
<i>patB</i>	ABC efluks pumpa	NOD_7
<i>tolC</i>	ABC efluks pumpa	NOD_7
<i>lfrA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_7
<i>Cmx</i>	MFS efluks pumpa	NOD_9
<i>vanHB</i>	VanH, rezistencija na glikopeptid	NOD_9
<i>msbA</i>	ABC efluks pumpa	NOD_10
<i>Sta</i>	Streptotricin acetiltransferaza	NOD_10
<i>gadW</i>	RND efluks pumpa	NOD_11
<i>Cmlv</i>	Hloramfenikol fosfotransferaza	NOD_11
<i>abeM</i>	MATE transporter	NOD_11
<i>rosA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_14
<i>mdtP</i>	MFS efluks pumpa	NOD_14
<i>sdiA</i>	RND efluks pumpa	NOD_14

<i>taeA</i>	ABC efluks pumpa	NOD_15
<i>fosC2</i>	FosC fosfotransferaza	NOD_18
<i>rphB</i>	Rifampin fosfotransferaza	NOD_19
<i>optrA</i>	ABC-F ATP-vezujući ribozomski zaštitni protein	NOD_19
<i>vanTC</i>	VanT; rezistencija na glikopeptid	NOD_19
<i>Blt</i>	MFS efluks pumpa	NOD_21
<i>patA</i>	ABC efluks pumpa	NOD_21
<i>yojI</i>	ABC efluks pumpa	NOD_21
<i>tcr3</i>	MFS efluks pumpa	NOD_24
<i>mexL</i>	RND efluks pumpa	NOD_26
<i>vanA</i>	Van ligaza	NOD_27
<i>abeS</i>	SMR (eng. <i>small multidrug resistance</i> ) efluks pumpa	NOD_29
<i>ermT</i>	Erm 23S ribozomska RNK metiltransferaza	NOD_32
<i>ceoA</i>	RND efluks pumpa	NOD_33
<i>vanUG</i>	VanU; rezistencija na glikopeptid	NOD_46
<i>gimA</i>	GimA makrolid glikoziltransferaza	NOD_46
<i>cfrC</i>	Cfr 23S ribozomska RNK metiltransferaza	NOD_47
<i>oxa-458</i>	OXA $\beta$ -laktamaza	NOD_71
<i>dfrA3</i>	Dfr, trimetoprim dihidrofolat reduktaza	NOD_81
<i>pmpM</i>	MATE transporter	NOD_81
<i>lsaC</i>	ABC-F ATP vezujući ribozomski zaštitni protein	NOD_86
<i>ykkD</i>	SMR efluks pumpa	NOD_93
<i>yojI</i>	ABC efluks pumpa	NOD_95
<i>fexA</i>	MFS efluks pumpa	NOD_104
<i>nalC</i>	RND efluks pumpa	NOD_107
<i>dfrC</i>	Dfr, trimetoprim dihidrofolat reduktaza	NOD_206
<i>carA</i>	ABC-F ATP vezujući ribozomski zaštitni protein	NOD_243
<i>mdtC</i>	RND efluks pumpa	NOD_322
<i>norB</i>	MFS efluks pumpa	NOD_362

## Prilog 6.

Aminokiselinska sekvenca YtnP laktonaze.

MATLTFPGQQVGDFTITAISDGYLTA SLDFLSNIDPADASNMQRDAGQKAPEAVHINCYVVRGAGRTV  
LIDAGAGGFRQWGGQLGTNLALAGIEPAAIDTILLTHAHPDHVGGLVNGAGEIAFPNAELVVHRREVG  
FWQDDGNLSRASERARGNFVAARRVFDA YGDRLRLFDDGQVLPGIDALPIPGHTDGHTGYLLESRDQ  
GLLVWGDVVHFPHIQIRPEVSIAFDHDASLAAATRSRLLDQVSSEGLLIAGMHLGERGFARIERMNGG  
YRLRYEREE

## Prilog 7.

Aminokiselinska sekvenca Y2-aiiA laktonaze. Osenčeni deo predstavlja signalnu sekvencu.

MRNLNWRRTGGMLVIAWCFGILASAACAAEPGGADQAPGFYRQQLGSLRIVALSDGTHPPVDTVFRDI  
SKDDIRRDLDRAFLEPPVQGSINAFVDTGTKRILVDSGAGVLYGDCCGKLLANLRAAGYAPEQIDEVL  
LTHLHKDHVGGIVTNGRMTFPNAVVRVNEIEANYWLDPDNKAQAPAFLASFFDAAAASVAPYVAAG  
RFKTFRGEATLAPGIRAVPMPGHTPGHTAYLIESGDAGLLAWGDIVHVAAIQLQDPDATVQYDSDADA  
ARRTRRDTLKRIVANKRYLVGAAHIAFPGLGHLRRDGEQYDWVPVNYDATPLR

## BIOGRAFIJA AUTORA

Milka J. Malešević rođena je 29. jula 1991. godine u Jajcu, Bosna i Hercegovina. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) upisala je 2010. godine, a osnovne akademske studije završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,48. Master akademske studije završila je 2015. godine na Biološkom fakultetu (modul Molekularna biologija i fiziologija, studijska grupa Genetičko inženjerstvo i biotehnologija) sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad pod nazivom "Molekularna karakterizacija *Achromobacter* vrsta izolovanih kod pedijatrijskih pacijenata" uradila je u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod mentorstvom dr Brankice Filipić, docenta i odbranila u julu 2015. godine. Tokom završnih godina osnovnih i master studija bila je nosilac plakete Dositeja i dobitnik istoimene stipendije Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije. Doktorske studije na Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota upisala je 2015. godine pod mentorstvom prof dr Branka Jovčića. Od aprila 2016. godine Milka Malešević uključena je na projekat Osnovnih istraživanja-Biologija OI 173019 "Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Zapadnog Balkana" u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Od maja 2018. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju kao istraživač pripravnik, a Odlukom Naučnog veća Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo izabrana je u zvanje istraživač saradnik jula 2019. godine.

Dobitnik je stipendije za mlade istraživače koju dodeljuje IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Wood-Whelan Research Fellowship) za tromesečni boravak na Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Napulj, Italija, kao i grantova koje dodeljuju FEMS (Federation of European Microbiological Societies) i ICGEB (The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) za učešća na letnjim školama u Dubrovniku, Hrvatska i Trstu, Italija.

Prvi je autor pet i koautor osam radova objavljenih u međunarodnim časopisima. Ima trinaest saopštenja na međunarodnim i domaćim konferencijama.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милка Малешевић

Број индекса М3005/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 10.11.2020.

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милка Малешевић

Број индекса М3005/2015

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa*

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

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 10.11.2020.

---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Идентификација и карактеризација биогених утишивача међућелијске комуникације врсте *Pseudomonas aeruginosa*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис аутора**

У Београду, 10.11.2020.

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.



OPEN

# *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of *N*-octadecanoylhomoserine lactones

Milka Malešević<sup>1</sup>, Flaviana Di Lorenzo<sup>2</sup>, Brankica Filipić<sup>1,3</sup>, Nemanja Stanisavljević<sup>1</sup>, Katarina Novović<sup>1</sup>, Lidija Senerovic<sup>1</sup>, Natalija Polović<sup>4</sup>, Antonio Molinaro<sup>2</sup>, Milan Kojić<sup>1</sup> & Branko Jovčić<sup>1,5\*</sup>

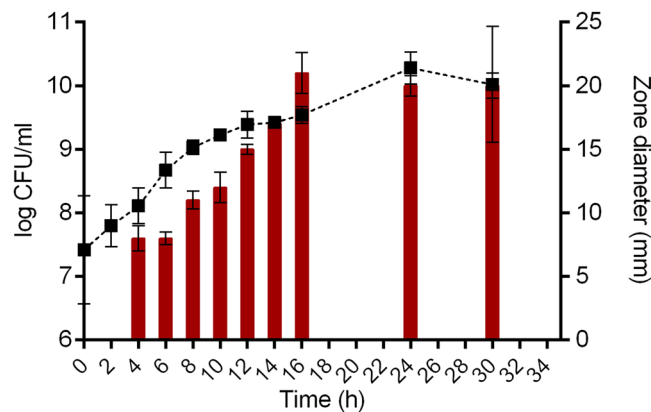
*Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common opportunistic pathogens that use quorum sensing (QS) system to regulate virulence factors expression and biofilm development. *Delftia* sp. 11304 was selected among 663 Gram-negative clinical isolates based on its QS inhibitory activity against *P. aeruginosa* MMA83 clinical isolate. Whole genome sequencing identified this isolate as *D. tsuruhatensis* and revealed genetic armamentarium of virulence factors and antibiotic resistance determinants. Ethyl acetate extract of *D. tsuruhatensis* 11304 culture supernatant (QSI extract) prevented biofilm formation of *P. aeruginosa* MMA83, but was unable to cause biofilm decomposition. QSI extract showed a synergistic effect in combination with meropenem and gentamycin, against *P. aeruginosa* MMA83. A dose-dependent reduction of the virulence factors: elastase, rhamnolipid and pyocyanin production by *P. aeruginosa* MMA83 and significant downregulation of *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *pqs* and *mvfR* expression were observed. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) mass spectrometry of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract revealed the presence of *N*-acyl homoserine lactones (AHL) with chain lengths of C12 to C18. The main ion peak was identified as *N*-octadecanoylhomoserine lactone (C<sub>18</sub>-HSL). Commercial C<sub>18</sub>-HSL (20 μM) reduced pyocyanin production as well as mRNA level of the *lasI* gene. A novel AHL species, dihydroxy-*N*-octadecanoylhomoserine lactone, was also described.

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the most significant opportunistic pathogens causing nosocomial infections with high morbidity and mortality, predominantly among immunocompromised and intensive care unit patients<sup>1–4</sup>. Pathogenic potential can be attributed to *P. aeruginosa* genomic plasticity and versatility which result in extensive genetic armamentarium of virulence factors and antibiotic resistance determinants<sup>5</sup>. Current increase in number of health care-associated infections caused by multidrug- (MDR) or extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* isolates, as well as their worldwide spread has been considered as worrisome due to limited therapeutic options<sup>6</sup>. The lack of efficient therapeutic options for infections caused by MDR/XDR *P. aeruginosa* is driving research towards alternative therapeutic approaches such as targeting social behaviors involved in pathogenesis as well as bacteriophages and vaccines<sup>7,8</sup>.

*P. aeruginosa* cells communicate through quorum sensing (QS) system, i.e. by synthesizing small signal molecules, which depending on the density of the population correlate the regulation of virulence factors expression, biofilm development, production of secondary metabolites and interaction with hosts<sup>9–11</sup>. *P. aeruginosa* employs three major interconnected QS systems that function independently and dependently involving *las*, *rhl*, *pqs* pathways as well as novel candidate *iqs* pathway regulated by several QS signal molecules<sup>12</sup>. *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) are the best characterized QS signal molecules. Different AHLs possess a homoserine lactone ring

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, 11010, Serbia.

<sup>2</sup>University of Napoli Federico II, Department of Chemical Sciences, Napoli, 80126, Italy. <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, 11221, Serbia. <sup>4</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, 11000, Serbia. <sup>5</sup>Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, 11000, Serbia. \*email: [bjovcic@bio.bg.ac.rs](mailto:bjovcic@bio.bg.ac.rs)



**Figure 1.** Growth phase dependence of QSI production by *Delftia* sp. 11304. Bacterial growth curve was determined by enumerating of colony forming units (CFU) at selected time points. Dependence of QSI activity from growth phase was determined at the same time points and expressed as numerical values obtained by measurement of inhibition zones of violacein production by *Chromobacterium violaceum* CV026.

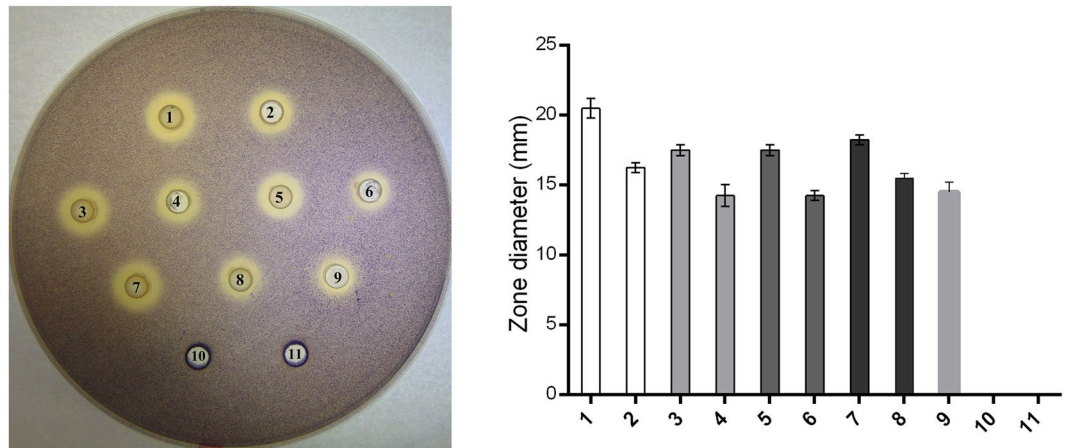
with an attached fatty acyl side chain of 4 to 20 carbons<sup>13,14</sup>. Detection of AHLs occurs either directly by LuxR regulators within the cell, or by membrane-bound two-component histidine kinase-type proteins<sup>15,16</sup>. Interestingly, long-chain AHLs, C<sub>10</sub>-AHL, C<sub>12</sub>-AHL and C<sub>14</sub>-AHL, were reported to bind to CviR AHL receptor in widely used reporter system *Chromobacterium violaceum* CV026 with the same affinity as C<sub>6</sub>-AHL autoinducer, but they disrupt activity of CviR in terms of transcriptional activation<sup>17,18</sup>. Disruption of QS achieved by interference with QS signaling or interception of signal molecules is considered a key point for development of antibacterial and anti-disease strategies targeting pathogens like *P. aeruginosa* in medicine<sup>19</sup>. Indeed, interference with QS signaling by QS-inhibitors (QSI) or interception of signal molecules by quorum quenching enzymes (QQE) results in a reduction of virulence regulated by QS. It is considered that QSI is a natural mechanism first developed either by QS-emitting organisms for the recycling or clearing of their own QS signals or by QSI organisms in the context of a competitive relationship with QS-signal-emitting organisms. Thus, bacteria that share ecological niche with *P. aeruginosa* during infections could be considered as promising producers of novel QSI molecules. Examples of the activity of QSI molecules, showing a successful reduction of siderophores, proteases, rhamnolipids secretion, as well as inhibition of biofilm formation have been previously documented. While those studies were mainly focused on *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 model strains<sup>9,20,21</sup> a still limited number of studies reported effects of QSI molecules on *P. aeruginosa* clinical isolates, especially MDR or XDR strains<sup>22</sup>. Diverse sources of QSI molecules that inhibit the virulence of *P. aeruginosa* have been described so far, both biogenic including plants, animals and bacteria<sup>23–25</sup> or derived by chemical synthesis<sup>26</sup>.

*Delftia tsuruhatensis* strains have previously been investigated as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) due to their production of siderophores which can mitigate iron limitation in soil<sup>27</sup>. However, recent findings pinpoint *D. tsuruhatensis* as an emerging pathogen associated with an increasing number of human infections<sup>28–30</sup>. It was previously published that *D. tsuruhatensis* could exhibit an anti-quorum sensing activity to *P. aeruginosa* quorum sensing systems, and authors identified a diisooctyl ester of 1,2 benzenedicarboxylic acid as an active compound<sup>31</sup>. Herein we analyzed inhibitory potential of *D. tsuruhatensis* 11304 clinical isolate against QS systems of *P. aeruginosa* MDR clinical isolate and characterized molecule(s) underlying this phenomenon.

## Results

**Clinical isolate *Delftia* sp. 11304 produces QSI molecule(s).** Among 633 clinical isolates from a Laboratory collection screened for quorum sensing inhibitory (QSI) activity (Supplementary Table 1) 19 strains (belonging to five genera) were selected as positive (Supplementary Table 2). *Delftia* sp. 11304 was selected as one of the most promising candidate with QSI activity. Growth phase dependence of the *Delftia* sp. 11304 QSI phenotype was determined, as the QSI phenotype could not be detected before 4 hours of growth, while the peak of QSI activity was observed after 16 hours (corresponding to the stationary phase). High production of QSI molecule(s) was retained after up to 30 hours of growth (Fig. 1). As a control QSI activity of previously characterized QSI molecules produced by *Delftia tsuruhatensis*: bis (2-ethylhexyl) phthalate and diisooctyl phthalate were tested in parallel. Neither of these compounds showed QSI activity at the used concentrations (ranging from 4 µg/ml to 1024 µg/ml) when tested in a colorimetric agar well diffusion assay using *Chromobacterium violaceum* CV026 as an indicator strain (Supplementary Fig. S1). Additionally, no measurable effects of bis (2-ethylhexyl) phthalate and diisooctyl phthalate neither on the viability of *C. violaceum* CV026 and *P. aeruginosa* MMA83 (Supplementary Table S3) nor to *P. aeruginosa* MMA83 biofilm production were detected (Supplementary Fig. S2).

**Whole genome sequencing.** Genomic DNA of the strain *Delftia* sp. 11304 was sequenced using Illumina HiSeq. 2500 platform (MicrobesNG, University of Birmingham, United Kingdom). A total of 6,616,336 sequences were generated from the genome. Assembly of reads resulted in 199 contigs with the largest contig 337425 and an average GC content of 66.78%. The contig dataset was used to determine the functional analysis. According



**Figure 2.** *D. tsuruhatensis* 11304 QSI activity was determined using colorimetric agar well diffusion assay with *Chromobacterium violaceum* CV026 as an indicator strain. (a) The activity of untreated control of *D. tsuruhatensis* 11304 overnight culture (1) and cell-free supernatant (2). The heat treatment at 100 °C for 30 min (3, 4) and 60 min (5, 6). *D. tsuruhatensis* 11304 overnight culture (3, 5) and cell-free supernatant (4, 6) retained QSI activity and shown to be thermostable. Proteinase K treatment did not affect QSI activity of *D. tsuruhatensis* 11304 overnight culture (7) and cell-free supernatant (8). Ethyl acetate extract of *D. tsuruhatensis* 11304 exhibits QSI activity (9). Proteinase K and LB growth medium with 0.5% DMSO (10, 11) are used as negative controls. (b) Quantitative data of these experiments obtained by measurement of inhibition zones of violacein production by *Chromobacterium violaceum* CV026.

to the genomic sequence analysis *Delftia* sp. 11304 was identified as a *Delftia tsuruhatensis* species. A repertoire of different virulence factors and antibiotic resistance determinants were detected in *D. tsuruhatensis* 11304 genome (Supplementary Tables 4 and 5). Among the virulence factors presence of the genes encoding for different siderophores, pyoverdine, pyochelin and ornitobactin, as well as capsule and alginate could be pointed out. Additionally, within the *D. tsuruhatensis* 11304 resistome antibiotic resistance determinants such as genes encoding for efflux pumps of Resistance-Nodulation-Division (RND) superfamily (including: *mexF*, *mexY*, *mexB*, *mexD*, *mexI*, *mexA*, *smeB*, *smeE*, *amrB* and *mdtB*), beta-lactamases genes *bla*<sub>OXA-258</sub> and *bla*<sub>LRA-13</sub>, as well as spiramycin resistance gene were identified as the most significant.

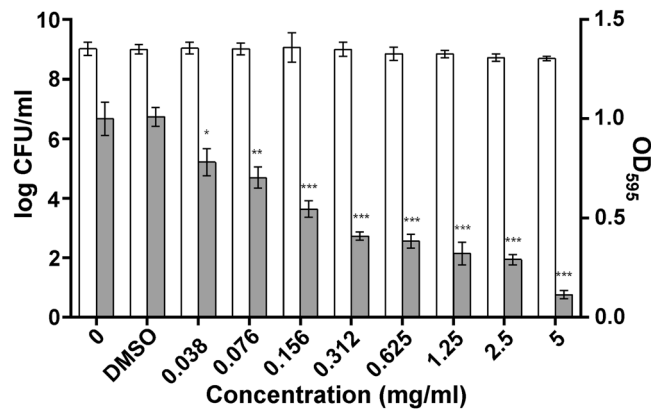
**Stability of the QSI molecule(s).** In order to determine whether *D. tsuruhatensis* 11304 QSI activity was based on proteinaceous or non-proteinaceous molecule activity, thermostability and resistance to proteinase were tested. Results showed that both overnight culture and cell-free supernatant retained QSI activity after the heat and proteinase K treatments (Fig. 2). Obtained results suggested that the QSI activity of *D. tsuruhatensis* 11304 was based on non-enzymatic quorum sensing inactivation mechanism.

**Ethyl acetate *D. tsuruhatensis* 11304 extract exhibits QSI activity and inhibits biofilm formation of *P. aeruginosa* MMA83.** Organic solvents with different polarity were used to optimize the extraction of the QSI molecule(s) from *D. tsuruhatensis* 11304 overnight culture supernatant. Only the ethyl acetate extract resuspended in DMSO was shown to be QSI active (Fig. 2), while methanol, chloroform and hexane extracts did not exhibit any QSI activity.

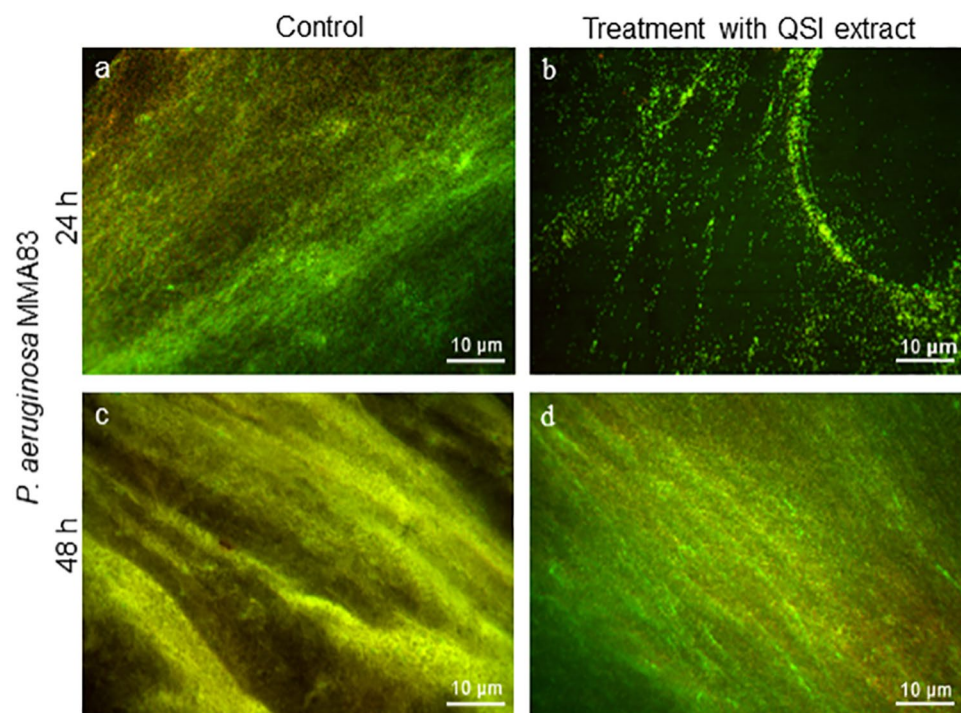
To exclude that the QSI effect of extract was a result of a bactericidal effect on the *P. aeruginosa* MMA83, we evaluated the antimicrobial activity of the QSI extract by microdilution method. As shown in Fig. 3, *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ethyl acetate extract had no statistically significant effect on the *P. aeruginosa* MMA83 growth.

Additionally, we have demonstrated that the inhibition of *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation by *D. tsuruhatensis* 11304 was dose-dependent using crystal violet staining of biofilm biomass (Fig. 3). Indeed, biofilm formation decreased by 88.5% in the presence of 5 mg/ml QSI extract comparing to the control (\*\**p* < 0.001). About 50% inhibition of biofilm formation was observed with a 0.156 mg/ml QSI extract (\*\**p* < 0.001). The lowest tested concentration of QSI extract (0.038 mg/ml) showed decreasing activity of 21.9% in regard to positive control (\**p* < 0.05). Treatment of *P. aeruginosa* MMA83 with the highest dose of DMSO used in experiment (0.5% v/v) had no statistically significant impact on bacterial growth and biofilm formation.

***D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract prevents biofilm formation of *P. aeruginosa* MMA83, but it is unable to induce biofilm decomposition.** Fluorescence microscopy has been used to visualize the effect of the QSI extract on *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation as well as on the decomposition of preformed biofilm. The captured images showed that *P. aeruginosa* MMA83 that grew in the absence of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract formed a compact biofilm. In the presence of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract biofilm was highly dispersed, with a clear decrease in the surface coverage and density of bacteria. Indeed, as shown in Fig. 4, minimal attachment of *P. aeruginosa* MMA83 cells could be observed in the treatment with a 5 mg/ml QSI extract (after 24 hours of incubation) (Fig. 4b).



**Figure 3.** The effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation ability measured by crystal violet staining. The *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract inhibits biofilm formation in a dose-dependent manner. *P. aeruginosa* MMA83 cell growth is represented by white (logCFU/ml), and biofilm formation by gray bars (OD<sub>595</sub>). Numbers on x-axis represent two-fold serial dilutions of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract with the unit of measure being mg/ml. DMSO – bacterial culture with 0.5% v/v of DMSO that is the highest concentration of DMSO in experiment (used when 5 mg/ml of QSI extract was added). Data analysis by Student's *t*- test demonstrates significant difference (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) between the treated biofilms and the control (DMSO treated control). No significant difference in the cell growth between treated and untreated controls was observed.



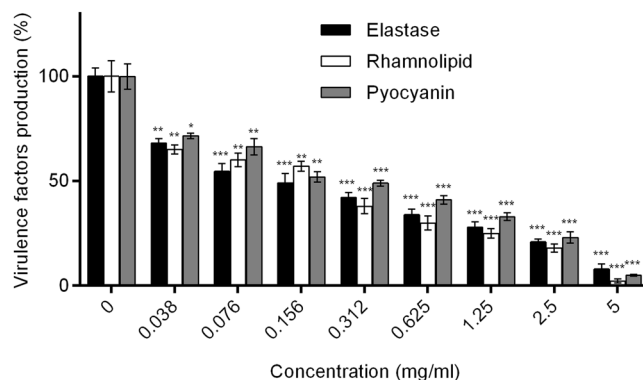
**Figure 4.** The effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation (a,b) and decomposition of preformed biofilms (c,d), captured with fluorescence microscopy. *P. aeruginosa* MMA83 was coincubated for 24 hours with 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract in order to visualize its effects on biofilm forming ability. The effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on decomposition of 24 hours old preformed biofilm was evaluated after 24 hours of treatment with QSI extract. Fluorescent dyes SYTO9 (green) and PI (red) were used for the visualization of biofilms. Scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

Interestingly, co-incubation of preformed *P. aeruginosa* MMA83 biofilm with the QSI extract (5 mg/ml) did not result in decomposition of the biofilm (Fig. 4d), although the biofilm architecture was less consistent and slightly different compared to the positive control (Fig. 4c), there were still visible living bacterial cells resembling the architecture observed in the positive control.



Antimicrobials	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMA83				
	MIC of each antimicrobial (mg/ml)		FIC	$\Sigma$ FIC	Outcome
	Alone	Combination			
QSI extract	20	1.25	0.0625	0.125	synergistic
Meropenem	0.512	0.032	0.0625		
DMSO	145.45	145.45	1	3	indifferent
Meropenem	0.512	1.024	2		
QSI extract	20	0.625	0.03125	0.047	synergistic
Gentamycin	4.096	0.064	0.0156		
DMSO	145.45	145.45	1	2	indifferent
Gentamycin	4.096	4.096	1		

**Table 1.** The checkerboard method representing the effect of antimicrobials against *P. aeruginosa* MMA83. FIC – fractional inhibitory concentration, FIC = MIC combination/MIC alone.  $\Sigma$ FIC – sum of two FICs,  $\Sigma$ FIC = FIC of antibiotic + FIC of QSI extract or DMSO.

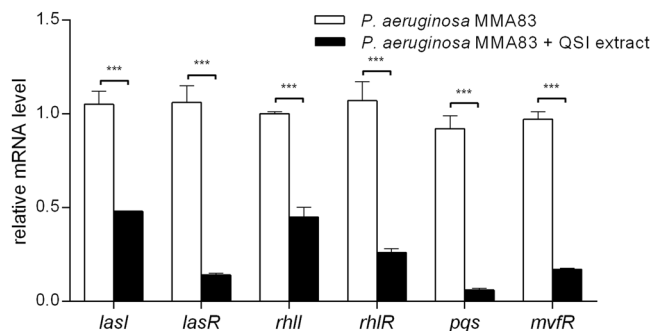


**Figure 5.** Graph demonstrating the dose-dependent effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on *P. aeruginosa* MMA83 virulence factors production. Black bars – production of elastase, white bars – production of rhamnolipid and gray bars – production of pyocyanin. Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test against control (0) without QSI extract (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

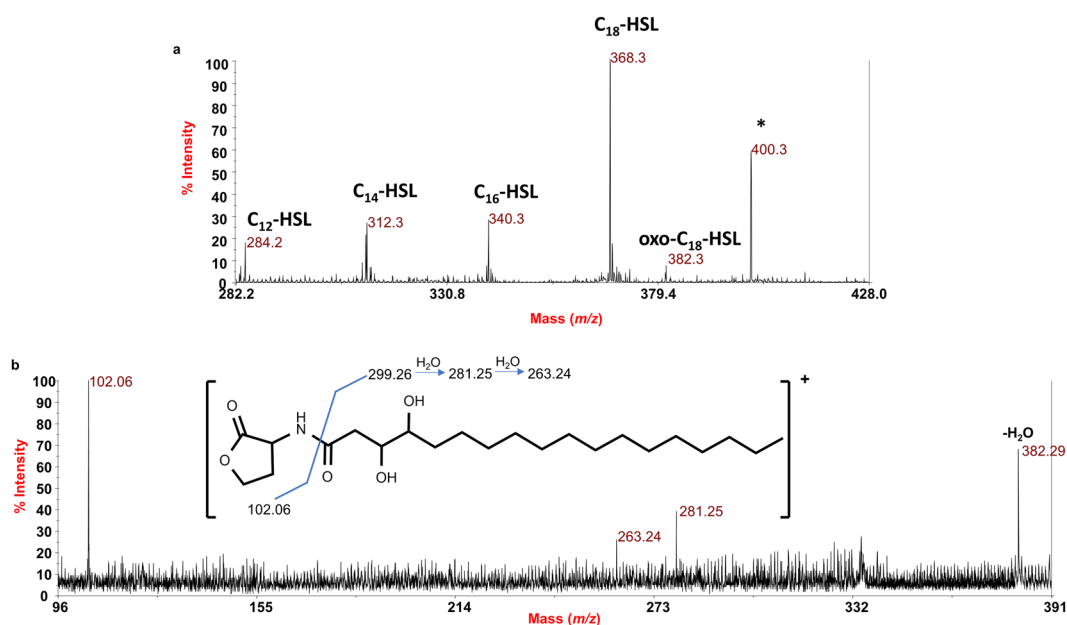
***D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract shows synergistic effect with antibiotics.** In order to investigate the clinical relevance of the QSI extract and its effectiveness in combination with clinically used drugs, the checkerboard method was assessed. Results indicate that the test strain *P. aeruginosa* MMA83 was susceptible to meropenem and gentamycin at very high used concentrations (MIC values 0.512 mg/ml and 4.096 mg/ml, respectively). MIC value of the *D. tsuruhatensis* QSI extract was 20 mg/ml. However, their combined application with the QSI extract showed a synergistic outcome for meropenem ( $\Sigma$ FIC = 0.125) and for gentamycin ( $\Sigma$ FIC = 0.047) (Table 1). DMSO (MIC value 145.45 mg/ml) had indifferent outcome for both of used antibiotics.

***D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract inhibits the virulence factors production of *P. aeruginosa* MMA83.** The impact of the QSI extract on the QS regulated virulence factors (elastase, rhamnolipid and pyocyanin) production in *P. aeruginosa* MMA83 was next investigated. A dose-dependent decrease in the production of all the analyzed virulence factors was observed (Fig. 5). The lack of the production of elastase, rhamnolipid and pyocyanin after treatment of the *P. aeruginosa* MMA83 strain with a 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract has been noticed. The treatment with a 0.156 mg/ml QSI extract resulted in about 40% inhibition of rhamnolipid and 50% inhibition of elastase and pyocyanin production compared to the positive control.

***D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract inhibits the expression of *P. aeruginosa* MMA83 QS systems.** In order to confirm that the above described effects of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on *P. aeruginosa* MMA83 virulence were caused by transcriptional inhibition of QS systems genes belonging to three *P. aeruginosa* QS networks (*las* – *lasI*, *lasR*; *rhl* – *rhlI*, *rhlR*; PQS – *pqs*, *mvfR*) were selected for RT-qPCR study. The obtained results revealed that the treatment of *P. aeruginosa* MMA83 with a 5 mg/ml QSI extract significantly decreased the mRNA levels (\*\*\**p* < 0.001) (Fig. 6). Relative expression of the genes coding for inducer synthases *lasI* and *rhlI* was 2.2 times lower, while the expression of transcriptional regulators *lasR* and *rhlR* was even more reduced (7.6 and 4.1 times lower, respectively) compared to the control. The most significant downregulation of transcription was observed in the case of the *pqs* gene (15 times lower), while the transcription of transcriptional regulator *mvfR* was 5.7 times lower compared to the control.



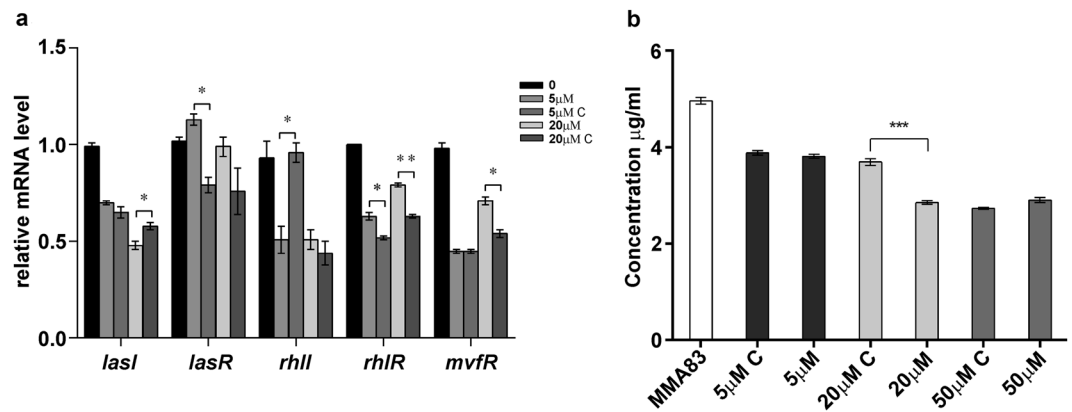
**Figure 6.** The changes of relative mRNA levels of QS genes without or with the treatment of *P. aeruginosa* MMA83 with a 5 mg/ml *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract. Genes examined in this study belong to three *P. aeruginosa* QS pathways (*las* – *lasI*, *lasR*; *rhl* – *rhII*, *rhIR*; PQS – *pqs*, *mvfR*). RT-qPCR data were normalized against the ribosomal gene *rpsL* as an internal control. Student's *t*-test was used to compare the differences between the control and experimental groups (\*\*\*)  $p < 0.001$ .



**Figure 7.** MALDI MS investigation of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract. (a) Positive ion MALDI MS spectrum recorded in reflectron mode of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract. (b) Positive ion MS<sup>2</sup> spectrum of precursor ion at  $m/z$  400.3. The relative AHL structure is reported in the inset. The position of the hydroxyl groups is tentative.

**Determination of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract composition by MALDI mass spectrometry.** To define the nature of the molecules composing the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract, an aliquot of the sample was preliminarily purified on a thin-layer chromatography (TLC) silica gel. Separated spots were visualized, and then scratched off. The silica gel was put into a cotton-plugged column, and the sample was eluted from the gel by ethyl acetate, dried and then investigated by MALDI mass spectrometry. Several solvents were employed to dilute and analyze the QSI extract; nevertheless, the best resolved spectra were obtained by diluting the QSI extract directly in the matrix solution (see Methods section for details).

The positive ion MALDI mass spectrum, recorded in reflectron mode, is reported in Fig. 7a. The spectrum clearly indicated the presence of several  $[M + H]^+$  ions attributed to *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) with chain lengths of C12 to C18. In particular, the main ion peak at  $m/z$  368.3 was identified as *N*-octadecanoylhomoserine lactone (C<sub>18</sub>-HSL). This was proven by the observation in the related positive ion MS<sup>2</sup> spectrum (Supplementary Fig. S3) of (i) the typical intense ion at  $m/z$  102.06, common to all AHLs detected, relative to the protonated  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butyrolactone deriving from the cleavage of the carboxamide linkage between the acyl chain and the homoserine group; (ii) the counterpart acylium ion arising from the same cleavage ( $m/z$  267.27) as well as (iii) the occurrence of a fragment originated from the loss of a water molecule from the  $[M + H]^+$  molecular ion ( $m/z$  350.29)<sup>32,33</sup>. Similarly, other AHLs species with a shorter acyl chain have been identified at  $m/z$  284.2 (C<sub>12</sub>-HSL),  $m/z$  312.3 (C<sub>14</sub>-HSL) and  $m/z$  340.3 (C<sub>16</sub>-HSL). In traces,



**Figure 8.** The QSI effect of commercial  $C_{18}$ -HSL to *P. aeruginosa* MMA83. **(a)** The changes of relative mRNA levels of QS genes without or with the treatment of *P. aeruginosa* MMA83 with commercial  $C_{18}$ -HSL. Genes examined in this study belong to three *P. aeruginosa* QS pathways (*las* – *lasI*, *lasR*; *rhl* – *rhlI*, *rhlR*; PQS – *mvfR*). RT-qPCR data were normalized against the ribosomal gene *rpsL* as an internal control. **(b)** The changes in pyocyanin production after the treatment of *P. aeruginosa* MMA83 with a commercial  $C_{18}$ -HSL. “C” on both graphs refers to the DMSO control. Student’s *t*-test was used to compare the differences between the control and experimental groups (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

*N*-3-oxo-octadecanoylhomoserine lactone (oxo- $C_{18}$ -HSL) has also been detected at  $m/z$  382.3 (Fig. 7a). In addition, a clearly intense peak at  $m/z$  400.3 was noted and isolated as  $MS^2$  precursor ion furnishing important structural data. The corresponding MALDI  $MS^2$  spectrum (Fig. 7b), revealed the occurrence of the common ion at  $m/z$  102.06 but also of an ion derived from the loss of water from the protonated molecular ion ( $m/z$  382.29).

**$C_{18}$ -HSL reduces pyocyanin production and quorum sensing *lasI* gene expression in *P. aeruginosa* MMA83.** In order to investigate QSI potential of  $C_{18}$ -HSL its effect on expression of quorum sensing genes and pyocyanin production in *P. aeruginosa* MMA83 was analyzed. Small but statistically significant decrease in pyocyanin production by MMA83 grown in presence of 20  $\mu$ M  $C_{18}$ -HSL was observed (Fig. 8b). In addition, the same concentration of  $C_{18}$ -HSL statistically significant reduced transcription of the *lasI* gene in MMA83, although the fold-change was small (Fig. 8a).

## Discussion

Our understanding of *Delftia tsuruhatensis* has experienced a complete turnaround from the promising plant growth-promoting bacteria to emerging human pathogen predominantly isolated from respiratory specimens, blood and urine<sup>27,30</sup>. There is a disparity between the growing importance of *Delftia* spp. isolates and genomic data from these species. Noticeably, *D. tsuruhatensis* genomic data are scarce since only the genome of *D. tsuruhatensis* MTQ3 is publicly available on NCBI. Although we could not speculate about the origin of the *D. tsuruhatensis* 11304 strain, which was characterized in this study (was it intrahospital, or an environmental strain introduced to the hospital by a patient), the presence of genetic determinants for the production of siderophores, capsule and alginate is a good indication of a possible virulent phenotype. Along with the genetic determinants of antibiotic resistance that were found within the *D. tsuruhatensis* 11304 genome, like beta-lactamases and RND pumps, that could contribute to the overall pathogenicity of this particular strain and could provide insight into the genetic armory of *D. tsuruhatensis* in general.

The reason why we included *Delftia* spp. in testing was our initial presumption that bacteria, like *D. tsuruhatensis* 11304, which colonize the same tissues during infection of a host as *P. aeruginosa*, probably compete with *P. aeruginosa* by employing diverse mechanisms, including the interference of cell-to-cell signaling, i.e. quenching of the quorum sensing systems. Diisooctyl ester of 1,2 benzenedicarboxylic acid, a compound that is called by several different names, was previously identified as a QSI molecule, produced by *Delftia tsuruhatensis*, active against *P. aeruginosa* PAO1 QS<sup>31</sup>. It is worth noticing that a contamination of laboratory samples by this compound was found when plastic tubes were used, since it is widely used as a plasticizer<sup>34,35</sup>. In addition, our data showed that within the range of concentrations used in this study, bis (2-ethylhexyl) phthalate and diisooctyl phthalate were unable to interfere with *C. violaceum* CV026 quorum sensing system or with *P. aeruginosa* biofilm formation. Thus, our main aim was to characterize the QSI potential of *D. tsuruhatensis* 11304 against *P. aeruginosa* by using *C. violaceum* and a multidrug-resistant clinical isolate *P. aeruginosa* MMA83 as model systems. The *D. tsuruhatensis* 11304 ethyl acetate extract showed a remarkable ability to attenuate *P. aeruginosa* MMA83 QS, and to suppress its virulent phenotype by disabling its intrinsic ability to form a biofilm or to produce virulence factors such as elastase, rhamnolipid and pyocyanin.

Biofilm formation ability of *P. aeruginosa* MMA83 was significantly impaired by the *D. tsuruhatensis* 11304 extract, without affecting overall bacterial cell growth. This reduction in biofilm forming ability occurred in a dose-dependent manner, similarly as previously reported for other QSI extracts<sup>36,37</sup>. However, the disruption of preformed biofilm was not achieved, which might result from biofilm matrix impermeability or possibility that it acts through QS inhibition. The production of extracellular virulence factors is of crucial importance for the invasion of host tissues, initial phases of biofilm formation and promoting virulence expression and it was shown

to be controlled by *las* and *rhl* QS systems<sup>38,39</sup>. Our study demonstrated that the *D. tsuruhatensis* 11304 extract was highly capable of attenuating *P. aeruginosa* virulence, and thus possibly infection, by significantly reducing the production of these virulence factors. This anti-virulent effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 extract was based on the inhibition on transcriptional level of *las*, *rhl* and *pqs* QS systems, indicating a possible therapeutic potential of the QSI molecule(s) produced by strain 11304.

Considering that clinical isolates of *P. aeruginosa* often possess MDR or even XDR resistant phenotype, novel strategy for clinical treatment of infections caused by such isolates could be the combination of antibiotics with non-antibiotic bioactive compounds. It has been reported that different QS inhibitors caused a decrease in antibiotic resistance in *P. aeruginosa* PAO1 through synergistic effects with clinically used drugs<sup>40,41</sup>. In our study, susceptibility of the MDR clinical isolate *P. aeruginosa* MMA83 to meropenem and gentamycin was enhanced by synergistic interactions of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract with antibiotics.

MALDI MS data showed that AHLs with chain lengths of C12 to C18 were present in the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract, with the main ion peak attributed to *N*-octadecanoylhomoserine lactone (C<sub>18</sub>-HSL). Interestingly, peak at *m/z* 400.3 was noted and isolated as MS<sup>2</sup> precursor ion furnishing important structural data. The corresponding MALDI MS<sup>2</sup> spectrum (Fig. 7b), revealed the occurrence of the common ion at *m/z* 102.06 but also of an ion derived from the loss of water from the protonated molecular ion (*m/z* 382.29). Two peaks at *m/z* 281.25 and 263.24, matching with the loss of one and two water molecules respectively from the acyl chain, suggested the occurrence of two hydroxyl groups decorating the acyl chain. None of the fragments helped in understanding the position of the two hydroxyl moieties; nevertheless, according to literature data, it could be assumed that a single hydroxyl group is placed at position 3 of the acyl chain whereas the position of the second remains to be defined. Therefore, a novel AHL species could be identified as composing the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract, specifically a dihydroxy-*N*-octadecanoylhomoserine lactone (Fig. 7b). Although C<sub>18</sub>-HSLs were previously described<sup>42</sup>, to our best knowledge this is the first report of a naturally occurring dihydroxy-*N*-octadecanoylhomoserine lactone. Finding that commercial C<sub>18</sub>-HSL reduces *lasI* quorum sensing gene expression and pyocyanin production indicates its involvement in virulent potential of *P. aeruginosa* MMA83. This finding is of importance since it is known that, in certain bacterial species, long-chain AHLs interfere with the short-chain AHLs-mediated QS signaling<sup>17,18</sup>. For example, C<sub>10</sub>-HSL fails to activate the CviR-dependent transcription in *C. violaceum* CV026, and yet functions as an antagonist in the presence of a native autoinducer C<sub>6</sub>-HSL. Additionally, it was shown that the lengthening of the AHLs' acyl-tails in the CV026 model system reduces agonism and enhances antagonism due to the promotion of an inactive conformation of the CviR:ligand complex<sup>43</sup>. It is tempting to speculate that the long-chain AHLs in the *D. tsuruhatensis* 11304 extract, among which a predominantly novel dihydroxy-*N*-octadecanoylhomoserine lactone is present, could be responsible for the interference of the *P. aeruginosa* MMA83 quorum sensing system and mitigation of its virulence. An analogy could be drawn to the CV026 quorum sensing system since *P. aeruginosa* doesn't produce AHLs with side chains longer than C12<sup>44</sup>. Our findings could be also supported with observations made by Zhu *et al.*<sup>45</sup>, who showed that one of the strongest antagonists of TraR, which is a 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL-responsive transcriptional activator in *Agrobacterium tumefaciens*, had also hydroxyl residues placed at position 3 of the acyl chain. The authors of mentioned study also claimed that the length of the side acyl chain was one of key determinants affecting antagonistic properties of synthetic AHLs used in their model system. We should take into account that the observed QSI activity could not be attributed solely to C<sub>18</sub>-HSL but to an orchestrated activity of several molecules from the extract, due to limited effect of C<sub>18</sub>-HSL comparing to the effect of entire 11304 QSI extract. Thus, our further work will be focused on the separation and identification of all the components in *D. tsuruhatensis* 11304 ethyl acetate extract, and testing of their QSI activities independently.

## Methods

**Bacterial strains and cultivation conditions.** Strain *Delftia* sp. 11304 from the collection of Laboratory for Molecular Microbiology (LMM), Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), University of Belgrade, used in this study was isolated in a co-culture with *Achromobacter xylosoxidans* 11304 from a cough swab<sup>46</sup> in a tertiary type hospital in Belgrade, Serbia. Quorum sensing inhibition (QSI) activity of 633 clinical isolates from LMM collection was tested by using AHL biosensor strain *Chromobacterium violaceum* 026 (CV026), a mini-Tn5 mutant deficient in the AHLs synthase *cviI*<sup>17</sup>. *Pseudomonas aeruginosa* MMA83, a New Delhi metallo-beta-lactamase-producing clinical strain from the laboratory collection (LMM, IMGGE) was used as a test strain<sup>47,48</sup>. The bacteria were cultured aerobically in either Luria–Bertani (LB) broth medium or Mueller–Hinton medium (MH) at 37 °C for all isolates except *C. violaceum* CV026 which was grown at 30 °C. M9 medium (10 x M9 salts - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl; 20% glucose; 1 M MgSO<sub>4</sub>; 1 M CaCl<sub>2</sub>; dissolved in miliQ water) supplemented with 0.24% pyruvate was used for bacterial cultivation on a large scale for extraction of molecule(s) that interfere with quorum sensing system.

**QSI detection assay.** Initial screening for *Delftia* sp. 11304 QSI activity was performed with colorimetric agar well diffusion assay using *Chromobacterium violaceum* CV026 as an indicator strain. Overnight culture of *C. violaceum* CV026 (0.5% v/v) was inoculated in Luria–Bertani soft-agar (0.5% v/v) with addition of 5 μM *N*-(hexanoyl)-l-homoserine lactone – HHL (Sigma–Aldrich, Missouri, USA) and overlaid on LB agar (17% v/v). Wells were made in lawn of the solidified LB soft agar. Wells were filled with 50 μl of *Delftia* sp. 11304 culture and incubated for 24 h at 30 °C in order to test QSI activity<sup>49</sup>. The absence of the violet color around the wells was considered as evidence of the inhibition of violacein pigment synthesis, and demonstrative of positive QSI activity.

QSI activity of *Delftia* sp. 11304 was monitored during different growth phases. Initially, 1% overnight culture was inoculated in fresh LB medium and grown at 37 °C, with aeration for 30 hours. Aliquots of bacterial culture were collected at different time points (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24 and 30 hours) and serial tenfold dilutions were



prepared for determination of CFU/ml number. In parallel, QSI activity was determined by colorimetric agar well diffusion assay where diameter of QS inhibition was measured. Experiment was done in triplicate.

Chemical compounds bis (2-ethylhexyl) phthalate and diisooctyl phthalate that possess the same molecular formula  $C_{24}H_{38}O_4$  (molecular weight 390.564 g/mol) and the same structural formula (diisooctyl phthalate) as a previously described quorum sensing inhibitor compound<sup>31</sup> were used in order to confirm their QSI and antibacterial activity. Two-fold serial dilutions (started from 1024 µg/ml to 4 µg/ml) of bis (2-ethylhexyl) phthalate and diisooctyl phthalate solutions (Sigma-Aldrich) dissolved in ethanol (1:1 ratio)-were tested for antibacterial activity on *C. violaceum* CV026 and *P. aeruginosa* MMA83, QSI activity (*C. violaceum* CV026) as well as biofilm forming effect (*P. aeruginosa* MMA83) using previously described methods.

**Whole genome sequencing and genome analyses.** Genomic DNA of *Delftia* sp. 11304 was sequenced using Illumina HiSeq by MicrobesNG service (MicrobesNG, IMI-School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham, UK). The quality of each sequencing library was assessed using FastQC<sup>50</sup>. IDBA-UD with multi k-mer mode outperformed the assembly using De Bruijn Graph methods<sup>51</sup>. In addition, unassembled reads were collected and assembled by Celera Assembler with the Best Overlap Graph-CABOG. Finally, raw reads were mapped to assembled scaffolds with Burrows Wheeler Aligner- BWA<sup>52</sup>. *Delftia* sp. 11304 was identified using the genome sequence and EzBioCloud 16S rRNA gene database available online at <https://help.ezbiocloud.net/ezbiocloud-16s-database/><sup>53</sup>.

Identification of genes coding virulence factors in the genome sequence was performed using virulence factor database (VFDB), an online resource for curating information about virulence factors of bacterial pathogens (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)<sup>54</sup> and Linux command line. Presence of the antibiotic resistance genetic determinants in the sequenced genome was determined by the publicly available database, The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>)<sup>55</sup> using Linux command line. Draft genome sequence of *Delftia tsuruhatensis* 11304 has been deposited at the NCBI GenBank database under accession number SMMJ00000000.

**Stability of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI molecule(s).** In order to test the thermostability of *D. tsuruhatensis* 11304 QSI activity, overnight culture and cell-free supernatant were incubated at 100 °C for 30 and 60 min. Additionally, a potential proteinaceous nature of QSI activity was tested by treatment of *D. tsuruhatensis* 11304 overnight culture and cell-free supernatant with proteinase K (500 µg/ml) at 37 °C for 3 hours. Residual QSI activities after the heat or proteinase K treatments were evaluated by colorimetric agar well diffusion assay.

**Preparation of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract.** Bacterial culture *D. tsuruhatensis* 11304 (five liters) was cultivated in M9 medium supplemented with 0.24% pyruvate for 24 h, at 37 °C, aerobically. After centrifugation at 13,680 x g, at 4 °C, for 30 min, the collected supernatant was divided into four glass flasks and each of them was extracted with an equal volume of methanol, chloroform, ethyl acetate and hexane (Sigma-Aldrich) with vigorous shaking for 30 min at room temperature. Extracts were evaporated to dry using a vacuum rotary evaporator at 50 °C for ethyl acetate and 30 °C for methanol, chloroform and hexane (Buchi Rotavapor, R200, Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, US) and the dry mass was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) for further analyses<sup>56,57</sup>. In order to avoid contamination with phthalates from plasticware all experiments were done in glassware.

**The effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation ability.** In order to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of ethyl acetate QSI extract dissolved in DMSO on *P. aeruginosa* MMA83 planktonic cells, a 5 mg/ml QSI extract (following two-fold serial dilutions) was inoculated with  $2 \times 10^5$  CFU/ml of the test strain using a 96-wells microdilution method. The MIC value was defined as the lowest concentration which inhibited bacterial growth. Controls were incubated with a concentration of DMSO equal to that used in the treatment (0.5% v/v). Number of CFU/ml was determined by plating serial tenfold dilutions after 24 h of incubation at 37 °C. The experiments were performed in sextuplicate and repeated three times. Afterwards, wells were washed to remove planktonic bacterial cells and stained with 0.1% (v/v) crystal violet (HiMedia Labs Pvt. Ltd., India)<sup>58</sup>. Biofilm formation was quantified by recording the absorbance at 595 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Austria).

The effects of the QSI extract on biofilm formation or decomposition of preformed biofilm were additionally visualized using fluorescent dye SYTO9 (TermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) and propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich)<sup>59</sup>. For visualization of biofilms, *P. aeruginosa* MMA83 ( $2 \times 10^5$  CFU/ml) was cocultivated with a 5 mg/ml QSI extract in 24-well plates (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Germany) which contained microscopic cover glass. After incubation (24 h, at 37 °C), the cells were washed 3 times with PBS and stained with SYTO9 (2.5 µM) and PI (2.5 µM), green and red fluorescent dyes, respectively. In order to test the decomposition of preformed biofilm in the presence of the QSI extract, *P. aeruginosa* MMA83 was cultivated for 24 hours, at 37 °C in 24-well plates, washed 3 times with PBS and, subsequently, treated with 5 mg/ml of QSI extract. After next 24 hours (48 hours in total), cells were washed and stained as previously described. Stained cells were visualized by fluorescence microscope (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, California, USA) under 20,000 × magnification. Untreated bacterial cells were used as a positive control.

**QSI extract effect on antibiotic MIC values against *P. aeruginosa* MMA83.** The combined effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract and selected, clinically relevant antibiotics against *P. aeruginosa* MMA83 were assessed using 96-well plate microdilution method. Serial dilutions of meropenem (2.048, 1.024, 0.512, 0.256, 0.128, 0.064, 0.032, 0.016, 0.008, 0.004 or 0.002 mg/ml) or gentamycin (4.096, 2.048, 1.024, 0.512, 0.256, 0.128, 0.064, 0.032, 0.016, 0.008, 0.004 or 0.002 mg/ml) were cross-diluted with serial dilutions of QSI extract (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.076 or 0.038 mg/ml) and DMSO (16, 8, 4, 2, 1, 0.5%). Different

Gene	Primer direction	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Source
<i>lasI</i>	Forward	5-GCGTGCTCAAGTGTTC AAGG-3	125	This study
	Reverse	5-GGGCTTCAGGAGTATCTTCCTGG-3		This study
<i>lasR</i>	Forward	5-GGAGTGGAGCGCCATCCTGCAG-3	127	This study
	Reverse	5-GGCGGCCGGTAGTTGCCGACG-3		This study
<i>rhlI</i>	Forward	5-CCATCCGCAAACCCGCTACATC-3	151	This study
	Reverse	5-CTCCAGACCGACGGATCGCTCGGC-3		This study
<i>rhlR</i>	Forward	5-GGGCGTGTTCGCCGTCCTGG-3	143	This study
	Reverse	5-GGTATCGCTCCAGCCAGGCCTTG-3		This study
<i>pqsA</i>	Forward	5-CCGGACCTACATTCTCTCCC-3	182	This study
	Reverse	5-CGATATCGGCCAGGCCTGC-3		This study
<i>mvfR</i>	Forward	5-GTCGGGACGGCTACAAGGTCG-3	129	This study
	Reverse	5-GATTGCGCGGACCCTGTTGAG-3		This study
<i>rpsL</i>	Forward	5-GCAACTATCAACCAGCTGGTG-3	231	This study
	Reverse	5-GCTGTGCTCTTGCAGTTGTG-3		This study

**Table 2.** List of primers used for RT-qPCR.

concentrations of DMSO were expressed in mg/ml (16% corresponds with 145.45 mg/ml, etc.) in order to calculate final outcome for fractional inhibitory concentration. Plates (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Germany) were filled with the bacterial suspension at a final density of  $2 \times 10^5$  CFU/ml. Cell density was recorded by OD<sub>600</sub> measurements using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Austria) after 24 hours of incubation at 37 °C. The experiments were performed in triplicate and repeated two times.

The fractional inhibitory concentrations (FICs) were determined according to the previously described check-board method<sup>60</sup>. The outcome was defined as a synergistic if the sum of two FICs (FIC of the antibiotic and FIC of the QQ extract) was  $\leq 0.5$ ; additive if  $0.5 < \sum \text{FIC} \leq 1$ ; indifferent if  $1 < \sum \text{FIC} < 4$ ; antagonistic if  $\sum \text{FIC} > 4$ .

**The effect of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract on the virulence factors production in *P. aeruginosa* MMA83.** *Elastase assay.* Supernatants of overnight culture of *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 were supplemented with two-fold diluted concentrations of the QSI extract (starting with 5 mg/ml, down to 0.038 mg/ml) and then mixed with Elastin-Congo red (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 2 mg/ml. After 24 h of incubation at 37 °C, with shaking (180 rpm), the mixtures were centrifuged at 15,700 x g for 15 min, after which the elastase activity was measured at 495 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Austria)<sup>61</sup>. Supernatant of *P. aeruginosa* MMA83 culture without the QSI extract treatment was used as a positive control.

*Rhamnolipid assay.* Rhamnolipid production was examined by acidification of supernatants with HCl (to pH 2) of the previously cultivated test strain (co-incubated with two-fold serial dilutions of the QSI extract or without the QSI extract)<sup>62</sup>. The absorbance was monitored spectrophotometrically at 570 nm by Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Austria).

*Pyocyanin assay.* *P. aeruginosa* MMA83 overnight culture (with two-fold dilutions of the QSI extract or without the QSI extract) was centrifuged at 15,700 x g for 15 min and pyocyanin was extracted from the supernatant using chloroform in a 1:2 ratio following the re-extraction of chloroform phase by 0.2 N HCl (3:1 ratio) according to the previously described method<sup>63,64</sup>. The concentration of pyocyanin was evaluated by measuring the absorbance of the red top layer at 520 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Austria). Concentrations, expressed as micrograms of pyocyanin produced per milliliter of culture supernatant, were determined by multiplying the optical density at 520 nm (OD<sub>520</sub>) by 17.072.

**Quantification of *P. aeruginosa* MMA83 quorum sensing genes expression by RT-qPCR.** Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to determine the expression levels of regulatory genes involved in quorum sensing. Primers used for the amplification of selected genes are listed in the Table 2. The total RNA was isolated from the test strain *P. aeruginosa* MMA83 (grown for 10 hours, at 37 °C) supplemented with the QSI extract (5 mg/ml) or without it by RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). The total RNA was then treated with DNase using an Ambion DNA-free<sup>TM</sup> Kit (ThermoFisher, MA, US) and reverse transcribed by a Rever-tAid RT Reverse transcription Kit (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. Further amplification was achieved with KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) in a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) under the following cycling conditions: incubation at 95 °C for 3 min and 40 cycles of 95 °C/15 s and 60 °C/1 min. RT-qPCR data was normalized against the ribosomal gene *rpsL* as an internal control following the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method<sup>65</sup>.

**Isolation of QSI molecules by TLC.** An aliquot (1 mg) of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract was dissolved in 100  $\mu$ l of ethyl acetate and was applied to TLC (Silica gel 60, F<sub>254</sub>, Aluminium sheets, Merck, Darmstadt, Germany) followed by developing with a mixture of chloroform and ethyl acetate in the ratio 5:4.

Separated spots were scratched off from the plate and the silica gel was put into a cotton-plugged column. The sample was then eluted from the silica gel with ethyl acetate.

**MALDI MS and MS<sup>2</sup> of the *D. tsuruhatensis* 11304 QSI extract.** The MS structural analysis was performed on an ABSCIEX TOF/TOF<sup>TM</sup> 5800 Applied Biosystems mass spectrometer equipped with an Nd:YLF laser ( $\lambda = 345$  nm), with a pulse length of  $<500$  ps and a repetition rate of up to 1000 Hz. The dried sample obtained after TLC separation was redissolved either in acetonitrile, ethyl acetate, or directly in an  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (5 mg/ml) in acetonitrile/TFA 0.1% (70:30)<sup>32</sup>. The prepared QSI extract (0.5  $\mu$ l) and matrix solution (0.5  $\mu$ l), or 1  $\mu$ l of the mixture were deposited on a stainless-steel plate and left to dry at room temperature. Each spectrum, acquired in positive ion mode, was a result of the accumulation of 2,000 laser shots, whereas 2,500 shots were summed for the MS<sup>2</sup> data acquisitions.

**The effect of the commercial C<sub>18</sub>-HSL on the pyocyanin production and quantification of quorum sensing genes expression in *P. aeruginosa* MMA83.** Commercial *N*-octadecanoylhomoserine lactone (C<sub>18</sub>-HSL) was purchased from Cayman Chemical (Tallin, Estonia) and resuspended in DMSO (0.5 mg/ml) according to manufacturer instructions. Concentrations of 5, 20 and 50  $\mu$ M C<sub>18</sub>-HSL were used for evaluation of pyocyanin production and quantification of quorum sensing genes (listed in Table 2) expression in the presence of C<sub>18</sub>-HSL. Each concentration of C<sub>18</sub>-HSL was compared with control containing the exact volume of DMSO without C<sub>18</sub>-HSL to eliminate biological effect of DMSO in the experiment. Pyocyanin productions was expressed in  $\mu$ g/ml as described previously<sup>63,64</sup>. Experiments were done as described above, in triplicate.

**Statistical analyses.** The statistical analyses and visualization were performed using GraphPad Prism software and SPSS 20.0 for Windows. The results are shown as means  $\pm$  standard errors. The differences between control and experimental groups were compared using Student's *t*-test. A *p* value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Received: 14 April 2019; Accepted: 26 October 2019;

Published online: 11 November 2019

## References

1. Araujo, D. *et al.* The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long term clinical outcomes in bronchiectasis. *Eur Resp J.* **51**, 1701953, <https://doi.org/10.1183/13993003.01953-2017> (2018).
2. Xie, J. *et al.* A 16-year retrospective surveillance report on the pathogenic features and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from FAHJU in Guangzhou representative of Southern China. *Microb Pathog.* **110**, 37–41, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.018> (2017).
3. Del Barrio-Tofino, E. *et al.* Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **61**(11), E01589–E01517, <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-17> (2017).
4. Yayan, J., Ghebremedhin, B. & Rasche, K. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. *PLoS ONE.* **10**(10), e0139836, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139836> (2015).
5. Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F. & Tümmeler, B. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbio.* **2**, 150, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150> (2011).
6. Oliver, A. *et al.* The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* **21–22**, 41–59, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002> (2015).
7. Fothergill, J., Winstanley, C. & James, C. E. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* **10**, 219–235, <https://doi.org/10.1586/eri.11.168> (2012).
8. Maraolo, A. E. *et al.* Management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: state of the art. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* **15**(9), 861–871, <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1367666> (2017).
9. Hentzer, M. *et al.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* **22**, 3803–3815, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg366> (2003).
10. Hentzer, M. *et al.* Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology.* **148**, 87–102, <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-87> (2002).
11. Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H. & Prince, A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* **68**, 4331–4334, <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4331-4334.2000> (2000).
12. Lee, J. & Zhang, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* **6**, 26–41, <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x> (2015).
13. Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C. & Camara, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **362**, 1119–1134 (2007).
14. Arashida, N. *et al.* Identification of novel long chain *N*-acylhomoserine lactones of chain length C<sub>20</sub> from the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **82**(10), 1683–1693, <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1490168> (2018).
15. Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 269–275 (1994).
16. Freeman, J. A., Lilley, B. N. & Bassler, B. L. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 139–149, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01684.x> (2000).
17. McClean, K. H. *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* **143**, 3703–3711 (1997).
18. Swem, L. R. *et al.* A Quorum-Sensing Antagonist Targets Both Membrane-Bound and Cytoplasmic Receptors and Controls Bacterial Pathogenicity. *Molecular Cell.* **35**(2), 143–153, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.029> (2009).
19. Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y. & Faure, D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev.* **40**(1), 86–116, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038> (2016).
20. Diggle, S. P. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem. Biol.* **14**, 87–96, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014> (2007).
21. Welsh, M. A. & Blackwell, H. E. Chemical genetics reveals environment-specific roles for quorum sensing circuits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell. Chem. Biol.* **23**, 361–369, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.006> (2016).
22. Guendouze, A. *et al.* Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. *Front Microbiol.* **8**, 227, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00227> (2017).
23. Koh, C. L. *et al.* Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors (Basel).* **13**(5), 6217–28, <https://doi.org/10.3390/s130506217> (2013).

24. Yang, F. *et al.* Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Letters*. **579**, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.060> (2005).
25. See-Too, W. S. *et al.* AidP, a novel N-Acyl homoserine lactonase gene from Antarctic *Planococcus* sp. *Scientific reports*. **7**, 42968, <https://doi.org/10.1038/srep42968> (2017).
26. Aleksić, I. *et al.* Long-Chain 4-Aminoquinolines as Quorum Sensing Inhibitors in *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*. **12**(5), 1425–1434, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01149> (2017).
27. Guo, H. *et al.* Comparative Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* MTQ3 and the Identification of Functional NRPS Genes for Siderophore Production. *BioMed Research International*. **3687619**, **8**, <https://doi.org/10.1155/2016/3687619> (2016).
28. Tabak, O. *et al.* Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. *New Microbiol.* **36**, 199–201 (2013).
29. Preiswerk, B., Ullrich, S., Speich, R., Bloemberg, G. V. & Hombach, M. Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *J Med Microbiol.* **60**, 246–8, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021238-0> (2011).
30. Ranc, A., Dubourg, G., Fournier, P., Raoult, D. & Fenollar, F. *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. *Emerg Infect Dis.* **24**(3), 594–596, <https://doi.org/10.3201/eid2403.160939> (2018).
31. Singh, V. K., Mishra, A. & Jha, B. Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity of *Delftia tsuruhatensis* Extract by Attenuating the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol.* **7**, 337, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00337> (2017).
32. Leipert, J., Treitz, C., Leippe, M. & Tholey, A. Identification and Quantification of N-Acyl Homoserine Lactones Involved in Bacterial Communication by Small-Scale Synthesis of Internal Standards and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **28**(12), 2538–2547, <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1777-x> (2017).
33. Morin, D., Grasland, B., Vallée-Réhel, K., Dufau, C. & Haras, D. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr. A.* **1002**, 79–92, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00730-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00730-1) (2003).
34. Nguyen, D. H., Nguyen, D. T. M. & Kim, E. K. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from laboratory equipments. *Korean J. Chem. Eng.* **25**(5), 1136–1139, <https://doi.org/10.1007/s11814-008-0186-z> (2008).
35. Reid, A. M., Brougham, C. A., Fogarty, A. M. & Roche, J. J. An investigation into possible sources of phthalate contamination in the environmental analytical laboratory. *Int J Environ Anal Chem.* **87**(2), 125–133, <https://doi.org/10.1080/03067310601071183> (2007).
36. Singh, V. K. *et al.* Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling*. **29**(7), 855–867, <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.807914> (2013).
37. Cho, H. S. *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by plant metabolite e-viniferin. *J. Agric. Food. Chem.* **61**(29), 7120–7126, <https://doi.org/10.1021/jf4009313> (2013).
38. Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756–5767 (1997).
39. Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* **10**, 599–606, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002> (2004).
40. Ding, X. *et al.* Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J. Med. Microbiol.* **60**(12), 1827–1834, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.024166-0> (2011).
41. Yang, Y. *et al.* A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology* **50**, 987–993, <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2149-7> (2012).
42. Marketon, M. M. *et al.* Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI Locus and the Production of Novel N-Acyl Homoserine Lactones. *Journal of Bacteriology*. **184**(20), 5686–5695, <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5686-5695.2002> (2002).
43. Chen, G. *et al.* A Strategy for Antagonizing Quorum Sensing. *Mol Cell.* **42**(2), 199–209, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003> (2011).
44. Soukariéh, F., Williams, P., Stocks, M. J. & Cámara, M. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *Journal of Med Chem.* **61**(23), 10385–10402, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00540> (2018).
45. Zhu, J. *et al.* Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **180**, 5398–5405 (1998).
46. Filipić, B. *et al.* Uncovering Differences in Virulence Markers Associated with *Achromobacter* Species of CF and Non-CF Origin. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. **7**, 224, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00224> (2017).
47. Jovčić, B. *et al.* Emergence of NDM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical isolates from Serbia. *Ant Agents and Chem.* **55**(8), 3929–3931 (2011).
48. Jovčić, B. *et al.* The clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* MMA83 carries two copies of the bla<sub>NDM-1</sub> gene in a novel genetic context. *Ant Agents and Chem. AAC.* 02312–12 (2013).
49. McLean, R. J. C., Pierson, L. S. & Fuqua, C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J. Microbiol. Methods* **58**, 351–360, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.016> (2004).
50. Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (2010).
51. Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M. & Chin, F. Y. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*. **28**(11), 1420–8, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174> (2012).
52. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. **26**(5), 589–95, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698> (2010).
53. Yoon, S. H. *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 1613–1617, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755> (2017).
54. Liu, B., Zheng, D. D., Jin, Q., Chen, L. H. & Yang, J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1), D687–D692, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080> (2019).
55. McArthur, A. G. *et al.* The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**(7), 3348–3357, <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13> (2013).
56. Wang, J., Quan, C., Wang, X., Zhao, P. & Fan, S. Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *Microbial Biotechnology* **4**, 479–490, <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00197.x> (2011).
57. Chang, H. *et al.* Strain identification and quorum sensing inhibition characterization of marine-derived *Rhizobium* sp. NAO14 *Royal Society Open Science* <https://doi.org/10.1098/rsos.170025> (2017).
58. Stepanović, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**, 891–899, [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x) (2007).
59. Milivojević, D. *et al.* Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathogens and Disease*. **76**(4), <https://doi.org/10.1093/femspd/fty041> (2018).
60. Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 1, <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301> (2003).
61. Alipour, M. *et al.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **65**(4.1), 684–693, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq036> (2010).



62. Rienzo, D. D., Kamalanathan, M. & Martin, P. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry*. 51(7), 820–827, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.007> (2016).
63. Saha, S., Thavasi, R. & Jayalakshmi, S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Research Journal of Microbiol.* 3(3), 122–128, <https://doi.org/10.3923/jm.2008.122.128> (2008).
64. Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. & Crawford, I. P. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*. 172, 884–900 (1990).
65. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 25, 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> (2001).

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia [Grant No. 173019]. MM was granted a Wood-Whelan Researcher Fellowship of International Union of Biochemistry and Molecular Biology. The Authors thank to Dr. Zorica Vasiljević, Dr. Dušan Milivojević, Dr. Vele Tešević and Dr. Goran Jovanović for their help.

## Author contributions

B.J., M.K. and A.M. conceived the experiments, M.M., F.L., B.F., N.S., K.N. and L.S. conducted the experiments, B.J., M.K., A.M. and N.P. analyzed the results, F.D.L., N.P., M.K., A.M., B.F. and L.S. revised the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52955-3>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.J.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



## *Burkholderia cepacia* YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of *Pseudomonas aeruginosa* via quorum quenching activity

Milka Malešević<sup>a</sup>, Nemanja Stanisavljević<sup>a</sup>, Katarina Novović<sup>a</sup>, Natalija Polović<sup>b</sup>, Zorica Vasiljević<sup>c</sup>, Milan Kojić<sup>a</sup>, Branko Jovčić<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11042, Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11158, Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> Institute for Mother and Child Health Care of Serbia "Dr Vukan Čupić", Radoja Dakića 8, 11070, Belgrade, Serbia

<sup>d</sup> Faculty of Biology, University of Belgrade, Studentski trg 1, 11000, Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Quorum sensing  
Quorum quenching  
Lactonase  
Virulence  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Burkholderia cepacia*

### ABSTRACT

*Burkholderia cepacia* is well known as the causative agent of infections in humans where often shares niche with other pathogens, like *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical isolate *Burkholderia* sp. BCC4135 was selected due to its strong quorum quenching (QQ) activity. Whole genome sequencing unveiled this isolate as *B. cepacia* with unique sequence type ST1485 and a myriad of genes belonging to resistome and virulome. Two QQ lactonases YtnP and Y2-aiiA originated from *B. cepacia* BCC4135 were cloned, expressed, and functionally characterized. They were active against a broad substrate spectrum of the N-acyl-homoserine lactones (AHLs). The YtnP lactonase was inactive, while Y2-aiiA was active against N-tetradecanoyl-DL-homoserine lactone (C14-HSL) which could imply the difference in their biological roles from the aspect of its quorum sensing (QS) autoregulation and interference with the QS systems of bacteria residing within the same niche. Both YtnP and Y2-aiiA were able to attenuate virulence potential of *P. aeruginosa* MMA83 clinical isolate declining its biofilm formation and virulence factors production. *B. cepacia* BCC4135 lactonases interfered with the *las*, *rhl*, and even *pqs* QS circuit of *P. aeruginosa* MMA83 transcription and the effect of combined enzymes was even more prominent. *B. cepacia* BCC4135 also employs the CepI/R QS system for governing its own virulence traits and possibly self-regulates the QQ/QS network through the different expression and activity of YtnP and/or Y2-aiiA. Our findings pointed out that BCC4135 lactonases could be exploited as an effective antivirulence drugs against *P. aeruginosa* and gave us a new insight into *B. cepacia* QQ/QS machinery.

### 1. Introduction

*Burkholderia cepacia*, a species that belongs to the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), has emerged as a multidrug-resistant opportunistic pathogen, causing severe human infections with a high rate of morbidity and mortality [1]. Many factors could contribute to *B. cepacia* dissemination in the hospital environment such as cross-transmission, frequent pulmonary procedures and to contacts with infected patients [2]. Notably, *B. cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* are recognized to co-aggregate in the lungs, causing severe respiratory diseases [3]. Nevertheless, few investigations have indicated that fitness values of *P. aeruginosa* were higher than those of *B. cepacia* during co-infections in mixed communities [4,5]. Quorum sensing (QS) secondary metabolites

produced by *P. aeruginosa* were reported to be effective against Bcc species [6]. On the other side, populations of *Burkholderia* are more tolerant to environmental conditions [4], indicating that the outcome of competition between these species is highly context-dependent [7].

*P. aeruginosa* has been recognized as a priority pathogen on the ESKAPE pathogen list that encompasses other five pathogens; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Enterobacter* spp. [8], due to its ability to resist antimicrobial agents as well as to expand the whole arsenal of virulence factors [9,10]. As *P. aeruginosa* possesses nearly all of the known mechanisms of antimicrobial resistance, empirical antibiotic treatment against this microorganism is often ineffective [11]. The occurrence of such resistance has triggered a search for novel alternative therapeutic

\* Corresponding author. Faculty of Biology, University of Belgrade, Studentski trg 1, 11000, Belgrade, Serbia.

E-mail addresses: [milkam@imgge.bg.ac.rs](mailto:milkam@imgge.bg.ac.rs) (M. Malešević), [nstan86@gmail.com](mailto:nstan86@gmail.com) (N. Stanisavljević), [katarinanovovic@imgge.bg.ac.rs](mailto:katarinanovovic@imgge.bg.ac.rs) (K. Novović), [polovicn@chem.bg.ac.rs](mailto:polovicn@chem.bg.ac.rs) (N. Polović), [zorica.vasiljevic@gmail.com](mailto:zorica.vasiljevic@gmail.com) (Z. Vasiljević), [mkojic@imgge.bg.ac.rs](mailto:mkojic@imgge.bg.ac.rs) (M. Kojić), [bjovic@bio.bg.ac.rs](mailto:bjovic@bio.bg.ac.rs) (B. Jovčić).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104561>

Received 10 May 2020; Received in revised form 8 September 2020; Accepted 5 October 2020

Available online 10 October 2020

0882-4010/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

approaches targeting the bacterial social behaviors involved in its pathogenesis [12].

*P. aeruginosa* uses cell-to-cell communication known as quorum sensing that allows bacteria to monitor their own population density via signal molecules [13] and subsequently control bacterial pathogenesis [14]. Different types of signal molecules have been identified so far, but the majority corresponds to the class of the N-acyl homoserine lactones (AHLs) [15]. The sophisticated hierarchy of the QS network in *P. aeruginosa* consists of sets of interconnected systems *las*, *rhl*, *pqs*, and *iqs* [10]. This complex network provides the flexibility in the regulation of virulence gene expression [16] responsible for biofilm development, production of secondary metabolites, and immune-evasive factors [14]. Therefore, innovative antivirulence therapy based on the interruption of QS pathways represents a promising strategy of disarming pathogens like *P. aeruginosa* during host colonization and infection [17].

There are various ways of QS disruption depending on the nature of the inhibitory molecules, targets as well as mode of action [18]. Two groups of these molecules have been discovered: the quorum sensing inhibitors (QSIs; non-proteinaceous nature) and the quorum quenching enzymes (QQ; proteinaceous nature). QQ enzymes have been found in different phyla, including bacteria, fungi, plants, and mammals [18]. According to the degrading mechanisms of AHL molecules, QQ enzymes are classified into three groups: lactonases, acylases, and oxidoreductases [19]. Most of the identified AHL lactonases belong to the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily of proteins. Despite the low protein identity shared among the different subgroups, metallo- $\beta$ -lactamases possess conserved HXHXDH motif required for AHL-degrading activity [20]. AHL lactonases such as AidB originated from *Bosea* sp, RmmL from *Ruegeria mobilis*, and MomL isolated from *Muricauda olearia* exhibit a broad substrate spectrum with respect to the acyl chain length of AHLs but differ in their enzymatic characteristics [21–23]. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the ability of these enzymes to degrade AHL signal molecules and subsequently to inhibit the biofilm development [24,25] and virulence factors production [21,26]. Therefore, the AHL lactonases are recognized as promising candidates for antivirulence therapy.

*B. cepacia* uses an AHL-based QS system to control biofilm formation and expression of extracellular proteins [27], leading to the development of resistor cells [28] and consequently misleading the host immune system. The CepI/R is a global regulatory QS system widely distributed across all *Burkholderia* species [27,29]. It has been reported that *Burkholderia* also uses an additional QS mechanism to regulate diverse physiological processes [29]. Moreover, Chan and coworkers [30] have revealed that *B. cepacia* possesses both QS and QQ systems in parallel, discovering a QQ enzyme AHL oxidoreductase, able to attenuate the virulence of plant pathogen *Erwinia carotovora*. Nevertheless, investigation of *B. cepacia* QQ capacity remains scarce, especially in the context of clearing and recycling its own QS signals. Therefore, the main goal of our study was to investigate the QS and QQ potential of a *B. cepacia* BCC4135 clinical isolate and its effectiveness against multidrug-resistant clinical isolate *P. aeruginosa* MMA83.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains, cultivation conditions, and chemicals

Strain *Burkholderia* sp. BCC4135 used in this study was isolated from a blood culture in a university-affiliated tertiary care hospital in Belgrade, Serbia, and deposited in the collection of the Laboratory for Molecular Microbiology (LMM), Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), University of Belgrade. The BCC4135 strain was selected among 633 clinical isolates from the LMM collection based on its AHL degradation ability [31] using an AHL biosensor strain *Chromobacterium violaceum* O26 (CV026) [32]. *Pseudomonas aeruginosa* MMA83, a multidrug-resistant clinical isolate from the laboratory collection (LMM, IMGGE) was used as a model system to evaluate the

antivirulence potential of *Burkholderia* sp. BCC4135 strain [33]. All bacterial strains (Table 1) were cultivated aerobically in Luria-Bertani (LB) broth medium or Mueller-Hinton medium (MH) at 37 °C except *C. violaceum* CV026 which was grown at 30 °C. Human keratinocyte HaCaT cell line was cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

Appropriate antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 100 µg/ml; tetracycline, 40 µg/ml; gentamicin, 40 µg/ml; penicillin, 100 U/ml; streptomycin, 100 µg/ml. N-butyryl-DL-homoserine lactone (C4-HSL), N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL), N-octanoyl-DL-homoserine lactone (C8-HSL), N-decanoyl-DL-homoserine lactone (C10-HSL), N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL), and N-tetradecanoyl-DL-homoserine lactone (C14-HSL) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All of the AHL stock solutions (0.5 mM) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at –20 °C for biological assays. AHL stock solutions (100 mM) for high-performance liquid

**Table 1**  
Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source/reference
<b>Strain</b>		
<i>Burkholderia</i> sp. BCC4135	QQ lactonases producer	[31]
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	ATCC 31532 derivative, <i>cvlI::Tn5xyIE</i> , Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	[32]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMA83	NDM-1 positive clinical isolate, Amp <sup>r</sup>	[33]
<i>P. aeruginosa</i> PAOJP2/pKD-rhlA	$\Delta$ rhlA PrhlA::lux, biosensor strain for detection C4-HSL	[43]
<i>P. aeruginosa</i> PA14-R3	$\Delta$ lasI Prsal::lux, biosensor strain for detection 3-oxo-C12-HSL	[44]
<i>E. coli</i> M15	lacZ $\Delta$ M15	Qiagen
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	supE $\Delta$ 44 lacU169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA	[48]
<i>E. coli</i> pRK2013	RK2 derivative Km <sup>r</sup> , self-transmissible	[50]
<i>B. cepacia</i> BCC302	Amp <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , conjugal transfer recipient strain, LMM collection	This study
<i>E. coli</i> pMP220	pMP220	[49]
<i>E. coli</i> pMP220YtnP	pMP220YtnP	This study
<i>E. coli</i> pMP220Y2-aiiA	pMP220Y2-aiiA	This study
<i>B. cepacia</i> BCC302 pMP220	pMP220	This study
<i>B. cepacia</i> BCC302 pMP220YtnP	pMP220YtnP	This study
<i>B. cepacia</i> BCC302 pMP220Y2-aiiA	pMP220Y2-aiiA	This study
<b>Plasmid</b>		
pJET 1.2	Amp <sup>r</sup> , PCR cloning vector	ThermoFisher
pQE30	Amp <sup>r</sup> , ColE1 replicon, His <sub>6</sub> expression vector	Qiagen
pMP220	Tet <sup>r</sup> , promoter probe vector	[49]
pJETYtnP	<i>ymP</i> lactonase gene cloned in pJET 1.2	This study
pJETY2-aiiA	<i>y2-aiiA</i> lactonase gene cloned in pJET 1.2	This study
pQE30YtnP	<i>ymP</i> lactonase gene subcloned in pQE30	This study
pQE30Y2-aiiA	<i>y2-aiiA</i> lactonase gene subcloned in pQE30	This study
pJETpYtnP	<i>ymP</i> lactonase promoter cloned in pJET 1.2	This study
pJETpY2-aiiA	<i>y2-aiiA</i> lactonase promoter cloned in pJET 1.2	This study
pMP220YtnP	<i>ymP</i> lactonase promoter cloned in pMP220	This study
pMP220Y2-aiiA	<i>y2-aiiA</i> lactonase promoter cloned in pMP220	This study

NDM-1-New-Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1; Km<sup>r</sup>-kanamycin-resistant; Sm<sup>r</sup>-streptomycin-resistant; Amp<sup>r</sup>-ampicillin-resistant; Gm<sup>r</sup>-gentamicin resistant; Tet<sup>r</sup>-tetracycline-resistant.

chromatography (HPLC) analysis were prepared in methanol except for C14-HSL (dissolved in n-propanol: methanol at 1:1 ratio). Ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (ONPG) (Sigma-Aldrich) stock solution (4 mg/ml) was prepared in sterile water and used for the  $\beta$ -galactosidase assay. Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; stock solution 1 M) purchased from Serva (Heidelberg, Germany) was applied for the induction of protein expression.

## 2.2. Detection of QS and AHL-degrading activity of *Burkholderia* sp. BCC4135

Preliminary screening for *Burkholderia* sp. BCC4135 QS and AHL-degrading activity was performed with agar well-diffusion assay, by using *C. violaceum* CV026 as an indicator strain. For QS phenotype detection, LB soft-agar (0.5% v/v) containing an overnight culture of *C. violaceum* CV026 (0.5% v/v) was overlaid on LB agar (17% v/v) and wells (diameter, 5 mm) were made in the plate. For investigation of AHL-degrading activity, LB soft-agar containing *C. violaceum* CV026 (0.5% v/v) was supplemented with 5  $\mu$ M C6-HSL. Wells were filled with 50  $\mu$ l of *Burkholderia* sp. BCC4135 culture and incubated for 24 h at 30 °C [32]. The intensity and size of the colored (violet) or clear zone around the wells is an indicator of the level of violacein pigment synthesis, and demonstrates QS or AHL-degrading activity, respectively.

QS and AHL-degrading activity of *Burkholderia* sp. BCC4135 was examined during its different growth phases. Initially, an overnight culture with optical turbidity equivalent to 0.05 McFarland standards (approximately  $1.5 \times 10^7$  CFU/ml) was inoculated in fresh LB medium and cultivated with aeration at 37 °C, for 24 h. Bacterial culture aliquots were collected at different time points (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, and 24 h – through all growth phases) and serial tenfold dilutions were prepared for determination of the colony-forming units (CFU) number. In parallel, QS and AHL-degrading activity was determined by agar well-diffusion assay. The experiment was performed in triplicate. In addition, proteolytic enzyme proteinase K (500  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) was applied for evaluating if the QS inhibitory molecule(s) originated from BCC4135 has/have the proteinaceous nature. *Burkholderia* sp. BCC4135 culture was incubated with proteinase K at 37 °C for 3 h. Residual QS inhibitory activity after proteinase K treatments was evaluated as previously described. Buffer containing proteinase K and culture without treatment were used as negative and positive controls, respectively.

## 2.3. Whole genome sequencing and genome analysis

Total genomic DNA from *Burkholderia* sp. BCC4135 was sequenced using Illumina HiSeq 2500 platform by MicrobesNG service (MicrobesNG, IMI-School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham, UK). De Bruijn Graph methods were applied for the assembling process, and the contigs shorter than 200 bp were eliminated [34]. Raw reads were mapped to assembled scaffolds with Burrows-Wheeler Aligner-BWA [35]. Gene annotation and prediction of the open reading frames (ORFs) of the whole genome sequence was conducted by Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (<http://rast.nmpdr.org>). The acquired data were analyzed using the SEED database [36].

MLST profile was obtained by analysis of allelic variation of seven housekeeping genes for *Burkholderia* species (<https://pubmlst.org/bcc/>). The individual strain was characterized by a sequence type (ST), which represents a unique combination of seven sequenced alleles.

Virulence factor database (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), a comprehensive repository of the virulence factors of bacterial pathogens, was applied for the identification of genes coding virulence determinants in *Burkholderia* sp. BCC4135 genome sequence [37]. The presence of the antibiotic resistance markers in the sequenced genome was determined by the public repository for collective curation of antimicrobial resistance genes, the Comprehensive Antibiotic Resistance

Database (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>) [38]. Draft genome sequence of *Burkholderia cepacia* BCC4135 has been deposited at the NCBI GenBank database under accession number JAACXU000000000.

## 2.4. Phylogenetic analysis of the *B. cepacia* BCC4135 QQ enzymes

*In silico* analysis of *B. cepacia* BCC4135 genome was performed in order to find the potential gene(s) coding for QQ enzyme using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algorithm. Uncovered sequences were compared with characterized QQ enzymes originated from different bacterial species and sequences as yet without assigned function originated from *Burkholderia* species deposited in the UniProt database (<https://www.uniprot.org/>). The alignment was performed using the Clustal W [39] algorithm and the phylogenetic trees were conducted by the neighbor-joining (NJ) method. The phylogenetic inferences between selected sequences were obtained by MEGA version 7.0 [40]. SignalP 5.0 server was used for prediction of the presence of signal sequence in QQ enzymes of *B. cepacia* BCC4135 [41].

## 2.5. Cloning of candidate QQ gene, expression, and purification

A forward primer for *y2-aiiA* lactonase gene started immediately downstream of the region coding for leader peptide sequence of 25 amino acids predicted by SignalP 5.0. Forward and reverse primers for both lactonase genes were designed with restriction sites for *Bam*HI and *Hind*III, respectively. Primer sequences used for amplification of *ytnP* and *y2-aiiA* lactonases genes were designed using Primer-Blast software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and presented in Table 2. DNA fragments of the *ytnP* and *y2-aiiA* lactonases genes of *B. cepacia* BCC4135 were amplified by PCR using Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Kit (ThermoFisher, MA, US) and appropriate primers. The *ytnP* and *y2-aiiA* amplicons were cloned into the pJET 1.2 cloning vector (ThermoFisher), yielding the constructs pJETytnP and pJETy2-aiiA (Table 1). Both lactonases genes were then transferred as *Bam*HI-*Hind*III fragments into the *Bam*HI/*Hind*III restriction enzymes predigested pQE30 expression vector (Qiagen, Hilden, Germany) to generate pQE30ytnP and pQE30y2-aiiA constructs. Obtained constructs have been sequenced to confirm the accuracy of the sequences and incorporation in-frame into the pQE30 vector. Expression and purification of YtnP (pQE30ytnP) and Y2-aiiA (pQE30y2-aiiA) were carried out with *E. coli* M15 (pREP-4) according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Expression of the recombinant enzymes was performed at 23 °C by induction of 0.1 mM IPTG, followed by purification using Ni-NTA agarose affinity chromatography in 8 M – 0 M urea gradient [42]. Recombinant lactonases were stored at –20 °C in 20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 50% glycerol and analyzed with 12.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).

## 2.6. Thermostability of the *B. cepacia* BCC4135 QQ enzymes

To determine the physical parameters that affect YtnP and Y2-aiiA lactonases activity, purified enzymes (final concentration of 10  $\mu$ g/ml) and C6-HSL (final concentration of 0.5 mM) were used in a subsequent thermostability test. Purified YtnP and Y2-aiiA were pre-incubated at different temperatures ranging from 30 to 100 °C (with an interval of 10 °C) for 30 min. After cooling, C6-HSL was added into the reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4) and incubated at 37 °C for 30 min. The residual AHL concentration was relatively quantified using *C. violaceum* CV026 biosensor strain assay [23]. Retained lactonases activity is expressed as the reciprocal value of residual C6-HSL. The experiment was performed in triplicate.

## 2.7. Bioluminescence assay

Overnight cultures of the reporter strains *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-



**Table 2**  
Sequences of the primers used in this study.

Gene	Primer direction	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	Reference
Primers used for cloning lactonases genes and promoters					
<i>ytnP</i>	Forward	<u>ATGGATCC</u> ACGCTTACCTTTCCC	58 °C	843	This study
	Reverse	GGCCGTAAAGCTTCACTCCTCGCGCTCATAGCGC			
<i>y2-aiiA<sup>a</sup></i>	Forward	<u>CGGGATCC</u> GAAACCGGGCGGTGCGG	69 °C	894	This study
	Reverse	CCCGAAGCTTCAACCGCAGCGGCGTCCGCGTCCG			
<i>ytnP promoter</i>	Forward	<u>GGATCC</u> CGCTGACGAAAATCTTG	57 °C	324	This study
	Reverse	<u>CTGCAG</u> CATCGTGCTTCTCCGGATCGGCG			
<i>y2-aiiA promoter</i>	Forward	<u>GGATCC</u> GCGCGCGTAAGTCGCG	64 °C	156	This study
	Reverse	<u>CTGCAG</u> CATGTCCGCTCCCGGTTGCGTATC			
Primers used for RT-qPCR analysis					
<i>anol</i>	Forward	GGATCTAGGGCGCTATCGG		145	This study
	Reverse	GGCGTTTCGCGCAAACACG			
<i>anoR</i>	Forward	CATTGCGGTGCGCGTCCGG		150	This study
	Reverse	GCGATCTGGTCCGACGTCCGG			
<i>ytnP</i>	Forward	GATGGCTACCTCACCGCGAG		134	This study
	Reverse	GATGAGCACGGTGGGCGCCG			
<i>y2-aiiA</i>	Forward	GGCAGCTCGGGATCGTCCG		123	This study
	Reverse	GCCGGTATCGACCAAGAACG			
<i>lepA</i>	Forward	GGCGATACCGTCAACGATG		138	This study
	Reverse	GTTGAGCTTCAAGCTTCTCG			
<i>lasI</i>	Forward	GCGTGCTCAAGTGTCAAGG		125	[31]
	Reverse	GGGCTTCAGGAGTATCTTCCTGG			
<i>lasR</i>	Forward	CTGTGGATGCTCAAGGACTAC		133	[54]
	Reverse	AACTGGTCTTGCCGATGG			
<i>rhlI</i>	Forward	CCATCCGCAAACCCGCTACATC		151	[31]
	Reverse	CTCCCAGACCGACGGATCGCTCGGC			
<i>rhlR</i>	Forward	GGGCGTGTTCGCGTCTCGG		143	[31]
	Reverse	GGTATCGCTCCAGCCAGGCTTG			
<i>pqsA</i>	Forward	GACCGGCTGTATTCGATTC		74	[54]
	Reverse	GCTGAACCAGGGAAGAAC			
<i>mvfR</i>	Forward	GTCGGGACGGCTACAAGGTGCG		129	[31]
	Reverse	GATTGCGCGGACCCTTGTGAG			
<i>rpsL</i>	Forward	GCAACTATCAACCAGCTGGTG		231	[31]
	Reverse	GCTGTGCTCTTGCAGTTGTG			

Restriction sites for *Bam*HI and *Hind*III enzymes of the *ytnP* and *y2-aiiA*, and restriction sites for *Bam*HI and *Pst*I enzymes of gene promoters are underlined.

<sup>a</sup> Amplified gene with forward primer did not include leader peptide sequence.

*rhlA*, and *P. aeruginosa* PA14-R3 (Table 1) were diluted to the optical turbidity equivalent to 0.05 McFarland standards and incubated with YtnP and Y2-aiiA lactonases (10 µg/ml, final concentration) in the presence of C4-HSL, 3-oxo-C12-HSL, and C14-HSL autoinducers (50 µM, final concentration). Bioluminescence assays were monitored in a 96-well black plate with a transparent bottom (Eppendorf, Hamburg, Germany). After 4 h of incubation (37 °C, 70 rpm), bioluminescence (light counts per second, LCPS) and cell density (OD<sub>600</sub>) were simultaneously measured with a Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems, Austria). Cell suspensions without lactonases (with added 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer: 50% glycerol) were used as a positive control. Bioluminescence values were normalized per cell density [44]. The tests were performed in sextuplicate with three independent repeats.

## 2.8. HPLC analysis of AHL degradation by BCC4135 lactonases

Potential of *B. cepacia* BCC4135 lactonases for degradation of AHLs was investigated by HPLC analysis. AHLs were dissolved in methanol and diluted using 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 to the final concentrations of 1 mM AHLs and 5% methanol. The lactonase enzyme samples (10 µg/ml, final concentration) were incubated with appropriate AHLs at 37 °C for 30 min. Products of the reaction mixture were extracted with ethyl acetate (twice), evaporated, and then re-dissolved in HPLC grade methanol. NaOH (1 M) was used as a control for the hydrolysis of the homoserine lactones.

Filtered samples were chromatographed on an UltiMate™ 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, MA, US) with UV/visible light (UV/VIS) detector set at 205 nm by using of a Hypersil GOLD column over C18 silica matrix, dimensions: 150 × 4.6 (Thermo Scientific). Samples were eluted at a flow rate of 0.5 ml/min following the previously described method [45].

## 2.9. The effect of *B. cepacia* BCC4135 lactonases on *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation and virulence factors production

**Fluorescence microscopy** was used for visualization of the YtnP and Y2-aiiA lactonases effects on biofilm formation. Briefly, test strain *P. aeruginosa* MMA83 ( $2 \times 10^5$  CFU/ml) was cocultivated with YtnP and Y2-aiiA (10 µg/ml) in 12-well plates (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Germany) which contained sterile microscopic cover glass. After 24 h of treatment at 37 °C, the cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with SYTO9 (2.5 µM, ThermoFisher) [31]. Stained cells were visualized by a fluorescence microscope (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, CA, US) under 20,000 × magnification. In order to eliminate the biological effect of Tris-HCl buffer and glycerol in the experiment, the positive control was incubated with an appropriate volume of 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer: 50% glycerol.

**Elastase assay.** Overnight culture supernatants of *P. aeruginosa* MMA83 were incubated with YtnP and Y2-aiiA lactonases (10 µg/ml) and Elastin-Congo red (Sigma-Aldrich) was added at a final concentration of 2 mg/ml. The mixtures were collected after 48 h of incubation (37 °C, 180 rpm), and centrifuged at 15,700 × g for 15 min. The elastase activity was quantified at 495 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems). Untreated culture supernatants were used as a positive control (with added 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer: 50% glycerol). The experiment was done in triplicate.

**Pyocyanin assay.** Pyocyanin was extracted from the overnight culture supernatant of the test strain as previously described [46]. *P. aeruginosa* MMA83 was supplemented with YtnP and Y2-aiiA (10 µg/ml), and pyocyanin extraction from the supernatant was performed using chloroform in a 1:2 ratio following the second extraction of chloroform phase by 0.2 N HCl (3:1 ratio). The amount of pyocyanin was

determined by recording the absorbance at 520 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems). Pyocyanin concentration was calculated by multiplication of the absorbance ( $A_{520}$ ) by 17.072. Untreated culture supernatants were used as a positive control (with added 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer: 50% glycerol). The experiment was done in triplicate.

**Rhamnolipid assay.** Supernatants of the previously cultivated test strain (incubated with lactonases as described above), was adjusted to pH 2.0 by using HCl [47]. Rhamnolipid production was monitored spectrophotometrically at 570 nm by Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems). Untreated culture supernatants were used as a positive control (with added 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer: 50% glycerol). The experiment was done in triplicate.

### 2.10. Construction of the lactonases gene promoter transcriptional fusions and $\beta$ -galactosidase assay

The *ytnP* and *y2-aiiA* lactonases genes promoter transcriptional fusions were constructed by following steps: the 324 bp (+3 to -321 relative to ATG of the *ytnP* gene) and 156 bp (+3 to -153 relative to ATG of the *y2-aiiA*) DNA fragments were amplified by PCR using Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Kit (ThermoFisher) and appropriate primers (Table 2) and cloned into the pJET 1.2 (ThermoFisher) giving the constructs pJETpYtnP and pJETpY2-aiiA (Table 1). The promoter-probe vector pMP220 digested with *Bgl*III/*Pst*I was used for subcloning of the lactonases promoter sequences as *Bam*HI-*Pst*I fragments upstream of *lacZ* gene, obtaining pMP220YtnP and pMP220Y2-aiiA constructs.

The standard heat-shock transformation was used for plasmid transfer into *E. coli* DH5 $\alpha$  [48]. Conjugation was carried out by triparental mating using *E. coli* pMP220YtnP and *E. coli* pMP220Y2-aiiA as donors and *B. cepacia* BCC302 as a recipient, with *E. coli* pRK2013 as a helper strain. Transconjugants were selected on LB agar medium supplemented with gentamicin (against donor and helper strains) and tetracycline (for transconjugants carrying pMP220 constructs). Used strains, resulting plasmids, transformants, and transconjugants are listed in Table 1.  $\beta$ -galactosidase activity was monitored according to the protocol described by Miller [51] with some modifications [52]. Briefly, overnight bacterial cultures were diluted to optical turbidity equivalent to 0.05 McFarland standards, inoculated into fresh LB medium supplemented with appropriate antibiotics, and cultivated at 37 °C with aeration for 24 h. Bacterial culture aliquots were collected at different time points corresponding to adequate growth phases- early (2 h), middle (6 h), late logarithmic (8 h), stationary (12 h), and late stationary phase (24 h) and immediately assayed.  $\beta$ -galactosidase activities were measured in cultures of transconjugants *B. cepacia* BCC302 pMP220YtnP and *B. cepacia* BCC302 pMP220Y2-aiiA. *B. cepacia* BCC302 strain carrying pMP220 vector was used as a negative control.  $\beta$ -galactosidase activity was expressed in Miller units (MU). The experiment was done in triplicate.

### 2.11. RT-qPCR analyses

Quantification of *B. cepacia* BCC4135 lactonases genes and QS genes expression. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to reveal the expression levels of regulatory genes involved in QS (*anoI*, *anoR*) and QQ (*ytnP*, *y2-aiiA*) of the *B. cepacia* BCC4135 clinical isolate. Primers used for the RT-qPCR amplification of the selected genes are listed in Table 2. The total RNA was isolated from *B. cepacia* BCC4135 at different time points of growth (2, 6, 8, 12 and 24 h) by RNeasy Mini Kit (Qiagen) and then treated with DNase using an Ambion DNA-free™ Kit (ThermoFisher). Reverse transcription was carried out by a Rever-tAid RT Reverse transcription Kit (ThermoFisher) following the manufacturer's protocol. Further amplification was conducted with FastGene IC Green 2 x qPCR Universal Mix (Nippon Genetics, Dueren, Germany) in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Waltham, MA, USA) under the following cycling conditions: incubation at 95 °C for 2 min and 40 cycles of 95 °C/5 s and 60 °C/32 s. Obtained data were then normalized against the elongation factor gene *lepA* as an endogenous control following the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [53]. Experiments were done in triplicate.

Quantification of *P. aeruginosa* MMA83 QS genes expression after lactonases treatment. The total RNA was extracted from the strain *P. aeruginosa* MMA83 previously cultivated in MH medium (grown for 12 h, stationary phase) without or with YtnP and Y2-aiiA (singularly or in combination) enzymes treatment (final concentration of 10  $\mu$ g/ml). The same volume of 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer: 50% glycerol was added in the positive control. Quantitative PCR analysis for the expression of the six regulatory genes involved in *P. aeruginosa* quorum sensing was done as described above. Primers used for RT-qPCR analysis are listed in Table 2. Normalization was conducted against the ribosomal gene *rpsL* as an internal control using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. Experiments were done in triplicate.

### 2.12. Cytotoxicity assay

To evaluate the cytotoxic effect of *B. cepacia* BCC4135 recombinant lactonases, human keratinocyte HaCaT cell line was used as a model system. HaCaT keratinocyte was cultivated in high glucose DMEM, supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Prior to analysis, HaCaT cells ( $2 \times 10^4$  CFU/ml) were plated in 96-well microtiter plates and incubated overnight at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The treatment of HaCaT with YtnP and Y2-aiiA enzymes (final concentration of 10  $\mu$ g/ml) was carried out under the appropriate conditions for 24 h.

For monitoring the cytotoxicity level of BCC4135 recombinant lactonases, Lactate dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Assay Kit was applied according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). Quantitative determination of LDH released from dead cells was measured at 490 nm using Plate Reader Infinite 200 pro (MTX Lab Systems). The experiment was done in triplicate.

### 2.13. Statistical analyses

The statistical analyses and visualization were done using GraphPad Prism software and IBM SPSS Statistics 21 for Windows. All data are shown as means  $\pm$  standard deviations. The differences between control and experimental groups were compared using Student's *t*-test. A *p* value cutoff of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

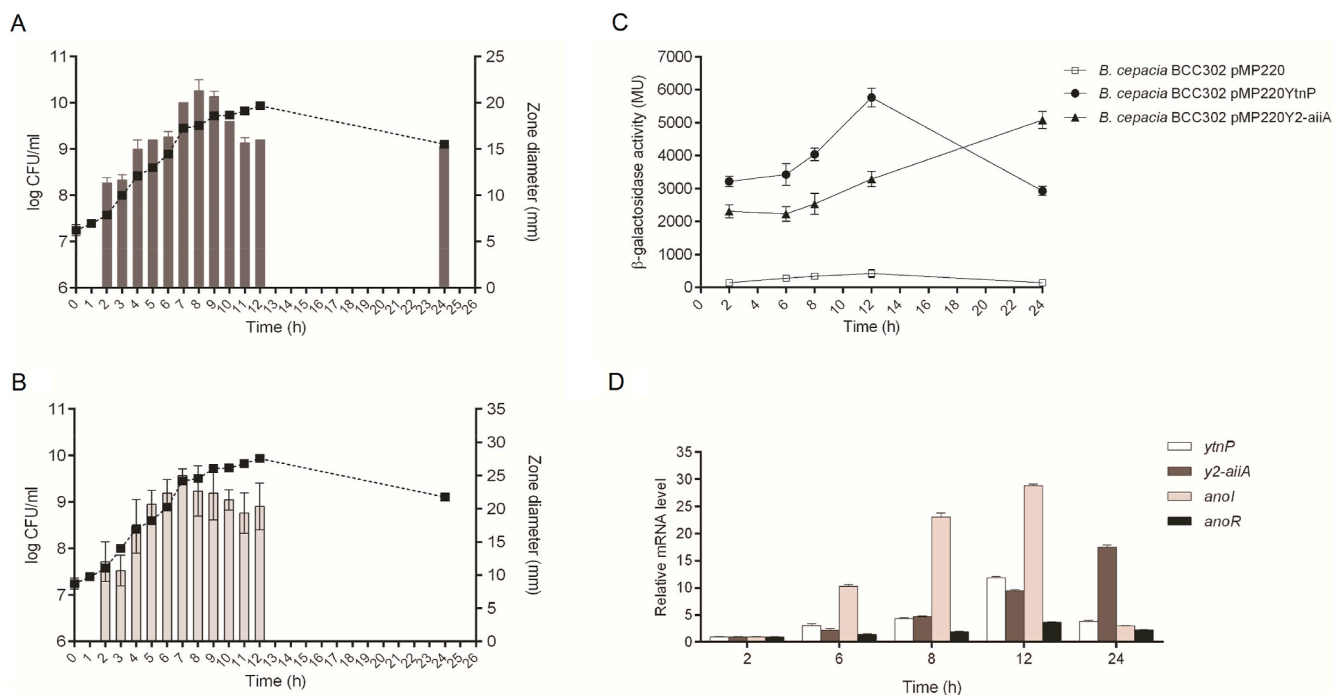
## 3. Results

### 3.1. Clinical isolate *Burkholderia* sp. BCC4135 produces QQ enzymes

In our previous study [31] *Burkholderia* sp. BCC4135 has been reported to be one of the most promising candidates for the ability to interfere with the QS system of *C. violaceum* CV026. The growth phase-dependence of the *Burkholderia* sp. BCC4135 QQ phenotype, revealed the peak of QQ activity after 8 h (late log phase) and QQ phenotype retained even after 24 h of bacterial growth (Fig. 1A). Also, we found that this strain possesses a QS phenotype, with the peak of QS activity during the late logarithmic and early stationary phase (Fig. 1B), while QS activity was not observed after 24 h of bacterial growth.

Bars represent zone diameter values on both graphs, while black squares correspond to the log CFU/ml values.

The strain also lost its quorum sensing inhibitory (QQ) activity after proteinase K treatment, which indicates that *Burkholderia* sp. BCC4135 produced an active QQ molecule of proteinaceous nature (data not shown).



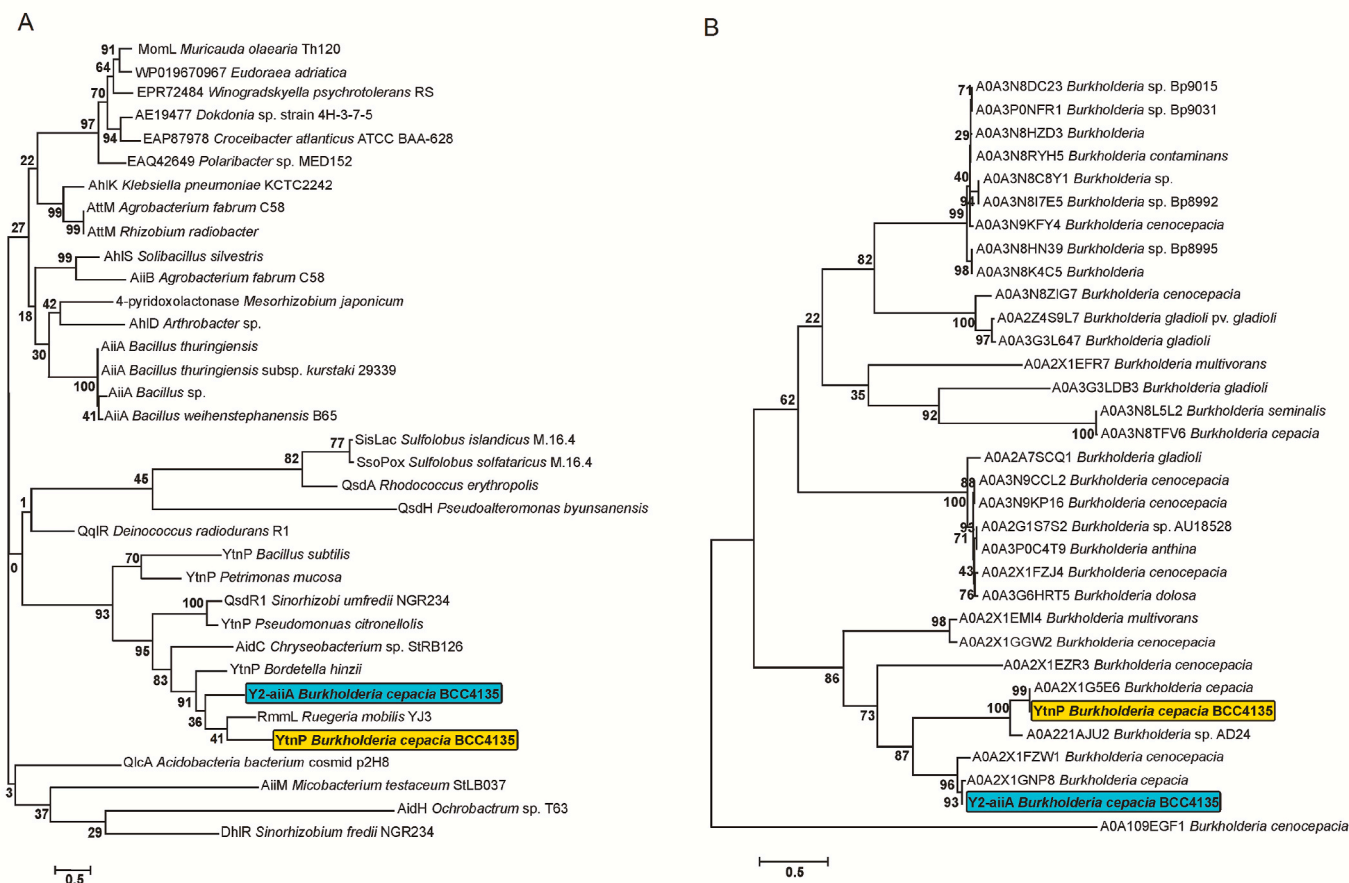
**Fig. 1.** Growth phase-dependence of QQ and QS phenotype of *Burkholderia* sp. BCC4135. The bacterial growth curve was defined by enumerating of colony-forming units (CFU) at the selected time points. **(A)** Dependence of QQ activity on the different growth phases was determined at the same time points and expressed as numerical values obtained by measurement of inhibition zones of violacein production by *C. violaceum* CV026. **(B)** Dependence of QS activity on the different growth phases was determined at the same time points and expressed as numerical values obtained by measurement of zones of violacein production by *C. violaceum* CV026. **(C)** *B. cepacia* BCC302 strain conjugated with promoter-probe vector pMP220 was used as a negative control.  $\beta$ -galactosidase activity was expressed in Miller units (MU). **(D)** The mRNA level of *B. cepacia* BCC4135 lactonases genes as well as QS genes encoding for homoserine lactone synthase (*anoI*) and transcriptional activator (*anoR*) were monitored. Obtained data were normalized against the elongation factor gene *lepA* as an endogenous control.

### 3.2. Whole genome sequencing

Whole genome sequencing was done in order to gain insight into complete genomic potential of *Burkholderia* sp. BCC4135 clinical isolate, including search for genetic determinants of QQ and QS molecules. Genomic DNA of *Burkholderia* sp. BCC4135 was sequenced using Illumina HiSeq 2500 platform (MicrobesNG). The genome size of the strain was determined to be 8,641,314 bp long. Assembly of the reads resulted in 434 contigs with the largest contig of 387,658 bp and an average GC content of 66.4%. The genome characteristics of the strain BCC4135 are described in detail in Table S1. MLST data analysis revealed that *Burkholderia* sp. BCC4135 carried new alleles for the *gltB* and *gyrB* house-keeping genes and had a unique sequence type ST1485, which was novel compared to those in *Burkholderia cepacia* complex MLST database. Allelic profiles for all seven loci are presented in Table S2. According to the MLST, *Burkholderia* sp. BCC4135 was identified as *Burkholderia cepacia* species. Genome analysis uncovered the abundance of different virulence factors and antibiotic resistance determinants (Table S3, Table S4). Among the most present virulence factor classes were those involved in adherence, motility, invasion, QS system, secretion system, biofilm formation, efflux pumps and endotoxins synthesis, iron uptake, and others. Additionally, resistome profile prediction for *B. cepacia* BCC4135 pointed out the presence of a number of genetic determinants encoding for efflux pumps of Resistance-Nodulation-Division (RND) superfamily (*ramA*, *adeL*, *mexJ*, *mexK*, *mexS*, *mexT*, *OprZ*, *nalD*), major facilitator superfamily (MFS; *farA*, *emrY*, *evgS*, *fact*, *qacA*, *cmrA*), AIM, AmpC and Nmca  $\beta$ -lactamases, tetracycline inactivation enzyme and streptogramin *vat* acetyltransferase.

### 3.3. *B. cepacia* BCC4135 harbors two AHL lactonases and QS machinery

Analysis of the annotated BCC4135 genome revealed the presence of candidate genes encoding for two lactonases designated as *ytnP* and *y2-aiiA*. In addition, *in silico* analysis indicated the presence of a QS gene cluster which encodes AHL synthase *anoI*, transcriptional activator protein *anoR*, and several genes encoding for homoserine lactone efflux proteins (Table S5). *B. cepacia* BCC4135 putative AHL synthase (*AnoI*) and transcriptional activator (*AnoR*) shared 99% identity to the *Burkholderia* CepI/R system when compared to those in the UniProt database. Putative QQ enzymes *YtnP* and *Y2-aiiA* are composed of 281 and 323 amino acid residues, respectively, and belong to the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily of proteins according to the BLASTp search against NCBI database. Multiple-sequence alignment of amino acid sequences of *YtnP* and *Y2-aiiA* with other representative AHL lactonases showed the presence of the consensus zinc-binding motif HXHXDH (Fig. S1), which is a commonly conserved sequence of the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily. The amino acid sequences of *YtnP* and *Y2-aiiA* showed 42% identity to lactonase Rmml and 43% to *YtnP* from *Bordetella hinzii*, respectively (Fig. 2A). *B. cepacia* BCC4135 lactonases shared 37% identity to each other and both belonged to the *YtnP* clade (Fig. 2A). Additionally, the high similarity was noticed between *B. cepacia* BCC4135 lactonases and experimentally unidentified putative lactonases from other *Burkholderia* species (Fig. 2B). *Y2-aiiA* was predicted to be extracellular with an N-terminal signal peptide of 25 amino acid residues based on SignalP 5.0 analysis, while no signal peptide was identified in the *YtnP* amino acid sequence.



**Fig. 2.** Phylogenetic analyses. Phylogenetic tree based on amino acid sequences showing relationships between AHL lactonases belonging to the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily of proteins. Sequence comparison was performed with characterized QQ enzymes originated from different bacterial species (A) and sequences without assigned function originated from *Burkholderia* species designated with UniProt accession numbers (B). The dendrogram was constructed by the neighbor-joining method with the Clustal W program using MEGA software package (1000 bootstrap replicates). Scale bar, 0.5 substitutions per amino acid position.

### 3.4. Cloning, expression, and purification of *B. cepacia* BCC4135 lactonases

Obtained constructs for both lactonases in pQE30 expression vector (pQE30Ytnp and pQE30Y2-aiiA) after IPTG induction were produced as inclusion bodies (even at 23 °C and 0.1 mM IPTG induction) with possible disulfide bonds (according to amino acid sequence analysis). The SDS-PAGE analysis showed that BCC4135 lactonases purified and refolded in urea gradient migrate with a molecular mass of approximately 31 kDa, which is consistent with their predicted molecular mass of ~31.2 (YtnP) and ~33 kDa (Y2-aiiA) (Fig. 3A). The applied assay showed that both recombinant refolded lactonases were active with ability to degrade C6-HSL (Fig. 3B).

### 3.5. *B. cepacia* BCC4135 lactonases showed moderate thermostability

Purified recombinant YtnP and Y2-aiiA enzymes retained relatively high level of activity after treatment of 30 min at temperatures from 30 to 60 °C for YtnP and 30–50 °C for Y2-aiiA (Fig. 3C).

The optimum activity was reached at 40 °C for both lactonases. The AHL-degrading activity of YtnP and Y2-aiiA continuously declined with the increase of the pre-incubation temperature. For YtnP, 50% activity was retained after pre-incubating at 70 °C, while Y2-aiiA retained 40% activity after pre-incubating for 30 min at 60 °C. Both enzymes were shown to have 25% activity at 80 °C and still possessed low activity after being boiled at 100 °C for 30 min.

### 3.6. Bioluminescence analysis

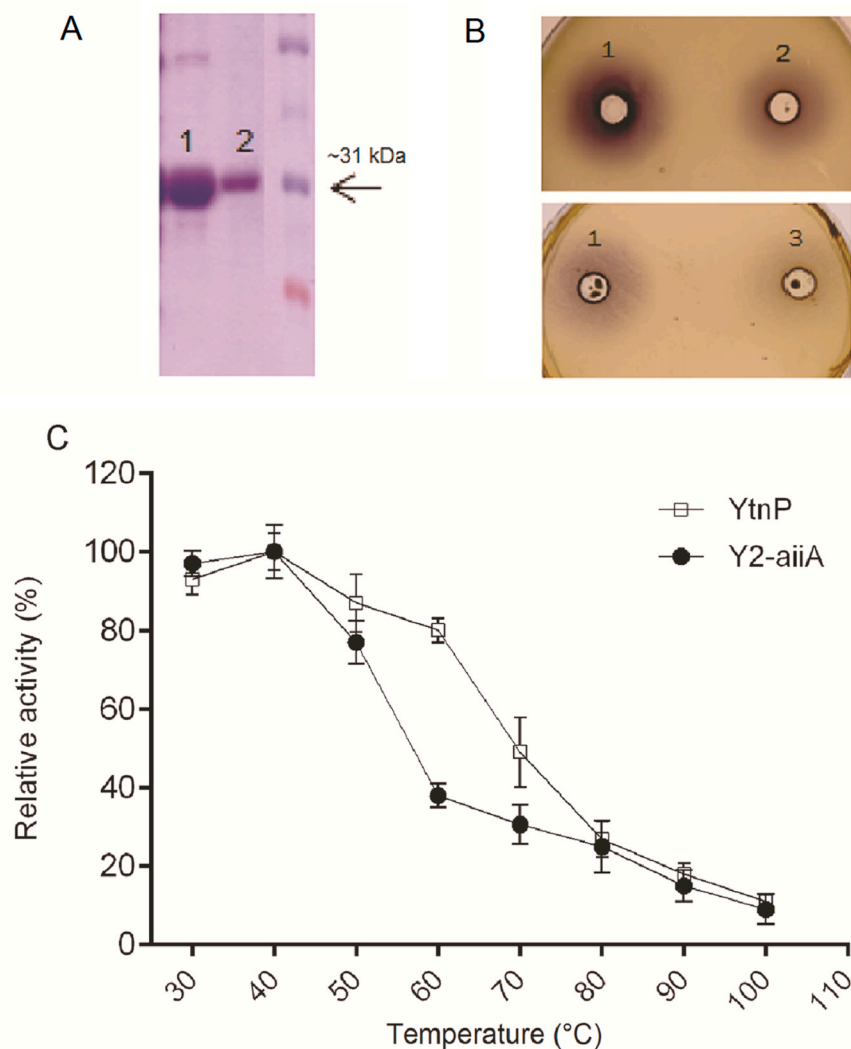
The ability of *B. cepacia* BCC4135 lactonases to interfere with *P. aeruginosa* QS *las* and *rhl* signaling pathways by degrading specific AHLs was monitored using bioluminescence assays. AHLs of short (C4-HSL) and long acyl chain (3-oxo-C12-HSL and C14-HSL) were used as substrates for monitoring lactonases activity. The obtained results demonstrated the ability of both recombinant enzymes YtnP and Y2-aiiA to degrade C4-HSL and to inhibit the *rhl* signaling pathway by around 30% (Fig. 4A).

Additionally, while YtnP degraded the long side-chain signal molecule 3-oxo-C12-HSL and thus affected *las* QS network reducing 20% of its activity, Y2-aiiA showed higher specificity to degrade 3-oxo-C12-HSL, reducing more than 50% activity of the *las* QS system (Fig. 4B) and also showed to be even more successful in degrading C14-HSL with over 60% activity (Fig. 4C) under tested conditions, while for YtnP it was not possible to detect degradation of C14-HSL using *P. aeruginosa* PA14-R3 as a biosensor.

### 3.7. *B. cepacia* BCC4135 lactonases showed broad substrate specificity

In order to determine the substrate specificity of *B. cepacia* BCC4135 lactonases, AHLs with different chain lengths (from 4 to 14C atoms) were used. The hydrolysis reactions were performed at 37 °C, optimum temperature for the cultivation of the lactonase-producing BCC4135 strain. Untreated AHLs were incubated under the same conditions and subsequently applied for HPLC analysis as standards. The HPLC analysis confirmed the results previously obtained by bioluminescence analysis.





**Fig. 3.** Purification, AHL-degrading activity, and thermostability of *B. cepacia* BCC4135 QQ enzymes. (A) SDS-PAGE analysis of the purified *B. cepacia* BCC4135 recombinant lactonases. The proteins were purified from recombinant *E. coli*. Lane 1 – YtnP, Lane 2 - Y2-aiiA. (B) Purified enzymes were shown to have AHL-degrading activity. Well 1– C6-HSL used as a positive control; well 2– retained C6-HSL activity after YtnP treatment; well 3- retained C6-HSL activity after Y2-aiiA treatment. AHL-degrading activity was determined using agar well-diffusion assay with *C. violaceum* CV026 as an indicator strain. (C) Graph presenting thermostability of YtnP and Y2-aiiA lactonases pre-incubated at temperatures ranging from 30 to 100 °C. The residual C6-HSL was relatively quantified using *C. violaceum* CV026 biosensor strain. Retained lactonases activity is expressed as the reciprocal value of residual C6-HSL.

Both lactonases were able to degrade C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, and C10-HSL (Fig. 5). Fractionation of AHLs standards revealed peaks with a retention time of 5.8, 10.2, 13.2, 15.2, 15.9 and 21.3 for C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL, and C14-HSL, respectively. The enzymatic digestion products contained peaks for all analyzed AHLs with a retention time of 3.2, 3.5, 5.2, 8.2, 9.3, and 11.3 min, from C4 to C14-HSL, respectively. Similar retention time for each AHL was observed in ring-opened products of AHLs by hydrolysis with 1 M NaOH. The main difference in substrate specificity occurred in long side-acyl chain homoserine lactones (3-oxo-C12-HSL and C14-HSL), especially for C14-HSL where Y2-aiiA exhibited the ability to degrade this homoserine lactone to some extent, while YtnP showed a complete lack of that ability, which is in good correlation with bioluminescence results.

### 3.8. *B. cepacia* BCC4135 lactonases inhibit *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation and virulence factors production

Fluorescence microscopy analysis showed that both YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit biofilm formation of *P. aeruginosa* MMA83. In the presence of YtnP and Y2-aiiA, biofilm formation was obstructed, with a clear decrease of biofilm confluence and density of bacteria on the surface. After 24 h of treatment, the captured images showed that *P. aeruginosa* MMA83 biofilm aggregates were more dispersed with the extracellular lactonase Y2-aiiA, showing higher antibiofilm activity

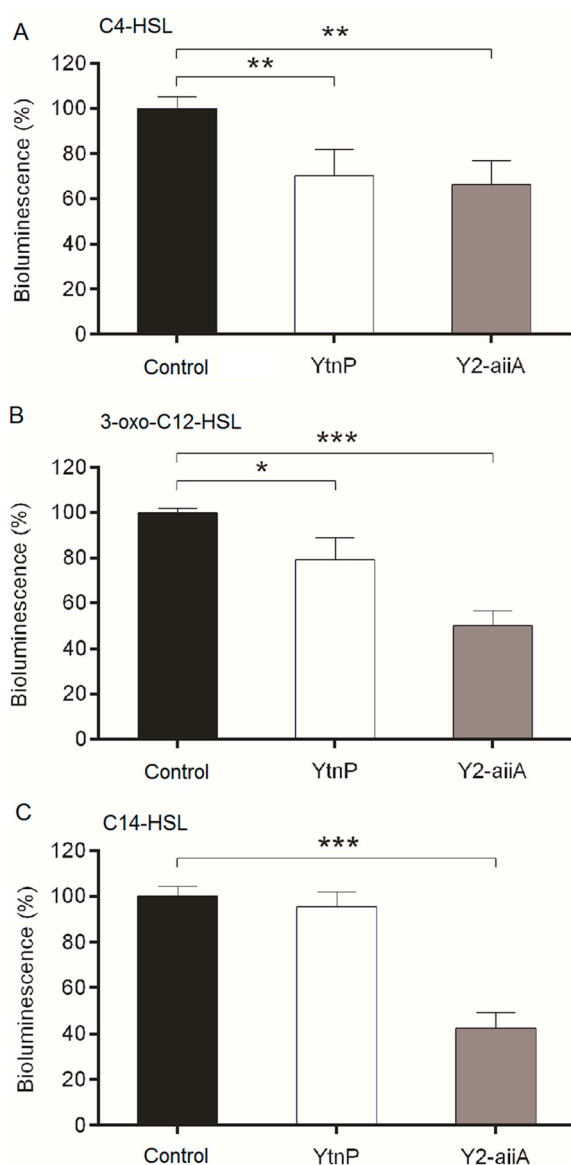
compared to YtnP (Fig. 6A).

The *P. aeruginosa* MMA83 test strain formed a compact biofilm in the absence of *B. cepacia* BCC4135 lactonases (Fig. 6A). In parallel, the growth of *P. aeruginosa* MMA83 planktonic bacteria was not affected after lactonases treatment (Fig. 6F).

The effect of YtnP and Y2-aiiA on the extracellular virulence factors production such as elastase, pyocyanin, and rhamnolipid in *P. aeruginosa* MMA83 was evaluated *in vitro*. YtnP and Y2-aiiA reduced the elastase activity of *P. aeruginosa* MMA83 by 37% and 70%, respectively (Fig. 6C). Similarly, adding *B. cepacia* BCC4135 lactonases significantly reduced pyocyanin production (Fig. 6D). Finally, the treatment with YtnP and Y2-aiiA resulted in about a 40% decrease of the rhamnolipid production for both lactonases compared to the positive control (Fig. 6E).

### 3.9. *B. cepacia* BCC4135 lactonases lower the expression of genes involved in *P. aeruginosa* MMA83 QS network

The impact of YtnP and Y2-aiiA enzymes on *P. aeruginosa* QS system was investigated by RT-qPCR to confirm the above-described effects of lactonases on *P. aeruginosa* MMA83 biofilm formation and virulence factors production. *P. aeruginosa* genes belonging to three QS network *las*, *rhl*, and *pqs* were selected: *las-lasI*, *lasR*; *rhl-rhII*, *rhlR*; *pqs-pqsA*, *mvfR*. The acquired data showed that the treatment of *P. aeruginosa* MMA83 with YtnP and Y2-aiiA enzymes significantly decreased the mRNA levels



**Fig. 4.** Bioluminescence analysis of AHL-degrading potential of *B. cepacia* BCC4135 lactonases. The activity of YtnP and Y2-aiiA was monitored using the following substrates: C4-HSL (A), 3-oxo-C12-HSL (B) and C14-HSL (C). Bioluminescence assays were observed by using the reporter strains *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-*rhlA* (for C4-HSL) and *P. aeruginosa* PA14-R3 (for 3-oxo-C12-HSL and C14-HSL). Bioluminescence values were normalized per cell density. Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test against positive control without enzymes treatment (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

of tested QS genes (Fig. 6B). The most prominent changes of transcription level were observed for the *lasR* and *rhlI* genes by both lactonases (2 and 2.1 times lower for YtnP and 5 and 4.5 times lower for Y2-aiiA, respectively). Relative expression of the gene encoding for the auto-inducer synthase *lasI* was 1.9 and 2.9 times lower after the treatment with YtnP and Y2-aiiA, while the expression of the transcriptional regulator *rhlR* was slightly less reduced (1.3 and 1.8 times lower, respectively) compared to the untreated control. Besides, *pqs* circuit (both genes *pqsA* and *mvfR*) was also downregulated after lactonases treatment. Y2-aiiA lactonase shown to be more effective in lowering the expression of all genes involved in QS network of *P. aeruginosa* MMA83. A more prominent effect on reduction of transcription was observed for all analyzed QS genes when both YtnP and Y2-aiiA enzymes were applied together (Fig. 6B).

### 3.10. Growth phase-dependence of lactonases gene promoter activity in *B. cepacia* BCC302

Activity dynamics of the *ytnP* and *y2-aiiA* gene promoters was examined, since phenotypic assays showed growth phase-dependence QQ enzymes activity (Fig. 1). The *ytnP* promoter fusion shows a continuous increase in activity until the onset of the stationary phase and then rapidly decline (the highest activity was observed at 12 h with a sharp decrease after 24 h) (Fig. 1C).

On the contrary, the level of  $\beta$ -galactosidase activity of the *y2-aiiA* promoter fusion showed gradual increment during growth phases, with the most prominent activity recorded in the late stationary phase. It was noted that the activity of the *ytnP* promoter was 1.5-fold higher than the *y2-aiiA* promoter activity during lag, log, and stationary phases, but after 24 h (in late stationary phase) was the opposite (Fig. 1C).

### 3.11. QS and QQ network of *B. cepacia* BCC4135 at a transcriptional level

The expression level of *B. cepacia* BCC4135 lactonases QQ genes as well as QS genes encoding for the AHL synthase (*anoI*) and the transcriptional activator (*anoR*) was monitored during different growth phases, with corresponding time points chosen according to CFU values. Changes in mRNA level of the selected genes examined by RT-qPCR are presented in Fig. 1D.

According to the obtained results, mRNA levels of QS and QQ genes varied during different growth phases. Each of the analyzed genes showed a trend of mRNA increment in the transition of bacterial culture from log to the stationary phase. After reaching the highest mRNA value at 12 h, intracellular lactonase *ytnP* gene mRNA, as well as *anoI* and *anoR* mRNAs decreased almost to the starting numbers after 24 h. However, the *y2-aiiA* mRNA value showed constant increment, with the highest level after 24 h, which is in line with the results obtained by analysis of transcriptional-promoter fusion with  $\beta$ -galactosidase (Fig. 1C).

### 3.12. Non-cytotoxic effect of *B. cepacia* BCC4135 lactonases on HaCaT keratinocytes

According to the results obtained by LDH cytotoxicity assay, neither of *B. cepacia* BCC4135 recombinant lactonases displayed statistically significant cytotoxic activity against human keratinocyte HaCaT cells when applied in dose of 10  $\mu$ g/ml (Fig. 7). LDH level in the supernatants of the treated cells was detected at a very low degree for YtnP enzyme ( $8.3\% \pm 1.25$ ), while for Y2-aiiA recombinant lactonase LDH level was non-detectable in comparison to the control.

## 4. Discussion

Species belonging to the *Burkholderia cepacia* complex are ubiquitous in the environment. Their ecological versatility is attributed to remarkably large genomes, composed of two or three replicons (chromosomes and megaplasmids) as well as to their ability to use a broad diversity of compounds as sole carbon and energy sources [55]. *B. cepacia* persists in the hospital environments mainly due to the capability of resistance to antibiotics and disinfectants and to patient-to-patient transmission, notably between individuals suffering from cystic fibrosis. In cystic fibrosis patients, the clinical outcome of Bcc colonization may vary considerably and include transient infection, long-term chronic infection, or rapid decline over a few weeks, sometimes leading to the development of the notorious 'cepacia syndrome' [55]. The *B. cepacia* BCC4135 clinical isolate harbors several genes belonging to resistome and virulome, indicating adaptation characteristics for strains from hospital environments and patients [56,57]. Considering that BCC4135 belongs to a novel ST1485, this could imply it is a novel strain in the hospital settings (acquired from the environment)

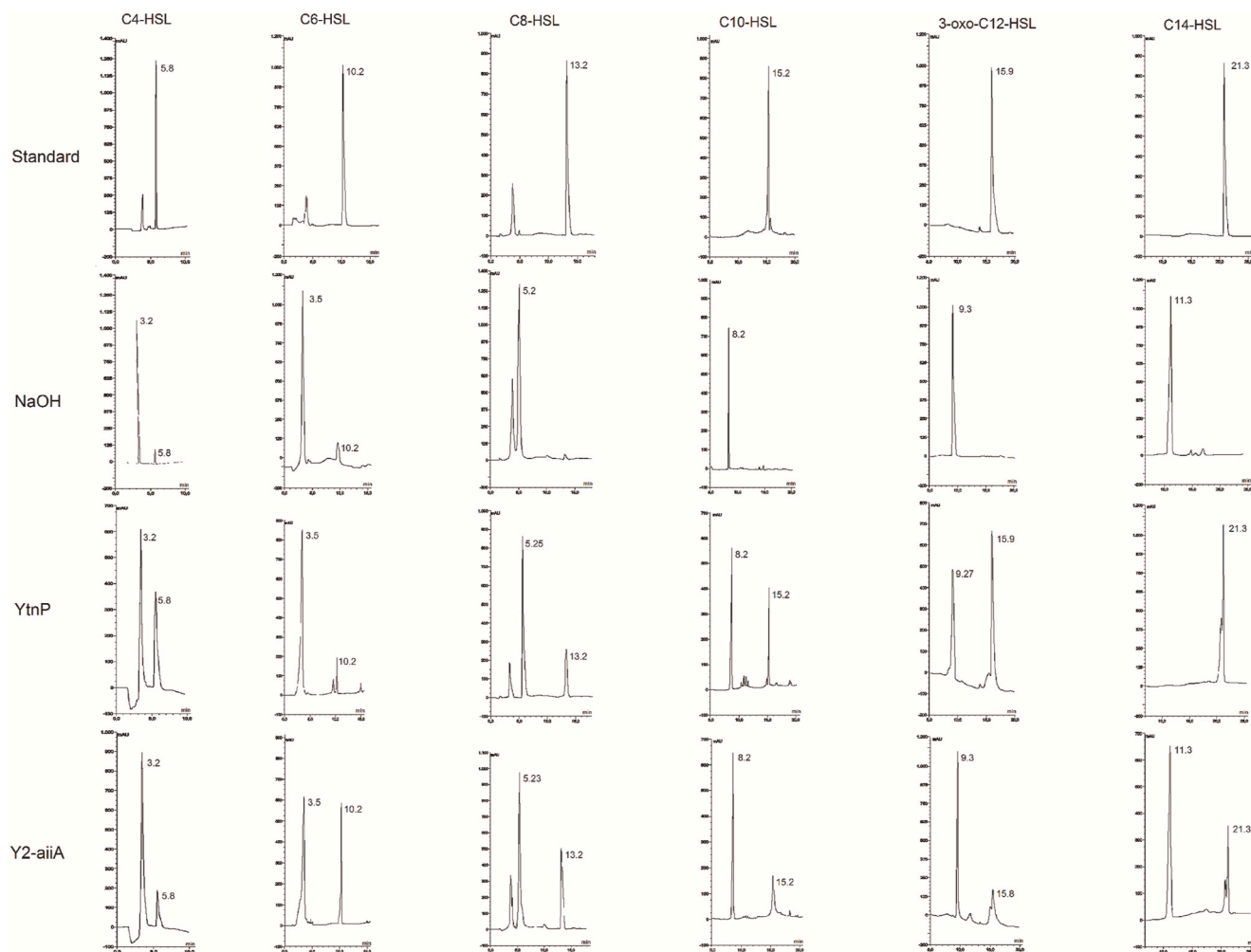


Fig. 5. HPLC analysis of AHLs degradation by *B. cepacia* BCC4135 lactonases and substrate specificity. AHLs standards, AHLs treated with 1 M NaOH, YtnP and Y2-aiiA, were incubated under the same conditions and subsequently applied for HPLC analysis. Main ion peaks of AHLs standards, as well as ring-opened products of AHLs are presented.

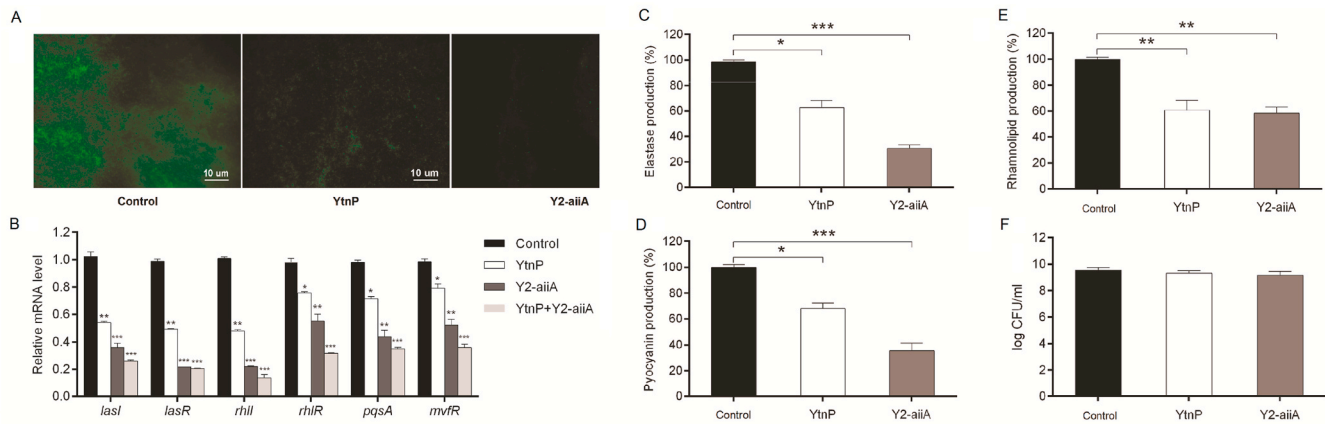
or has not been detected previously due to the lack of pathogenic capacity.

Multispecies social interactions are of crucial importance for shaping bacterial pathogenicity [7]. *P. aeruginosa*, one of the most significant human pathogens, uses both cooperative and competitive strategies to conquer a variety of niches. In response to *P. aeruginosa*, neighboring microorganisms react by employing different defense mechanisms. Our initial hypothesis was that *B. cepacia* manages to share the same niche with *P. aeruginosa* during infection by disrupting of the QS system of its opponent. Indeed, our research identified two QQ lactonases originated from *B. cepacia* BCC4135 with prominent anti-QS potential. As most of AHL lactonases, YtnP and Y2-aiiA enzymes belong to the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily of proteins with conserved HXHXDH zinc-binding motif and aspartate and histidine residues required for AHL-degrading activity [20]. YtnP and Y2-aiiA share around 40% identity with their phylogenetically closest AHL lactonases which indicate high diversity between these enzymes [18,21]. Although the majority of identified lactonases are known not to possess a leader peptide, Y2-aiiA was predicted to be extracellular, the same as MomL from *Muricauda olearia* [21]. To the best of our knowledge, this is the first report of experimentally verified QQ lactonases in *Burkholderia* species.

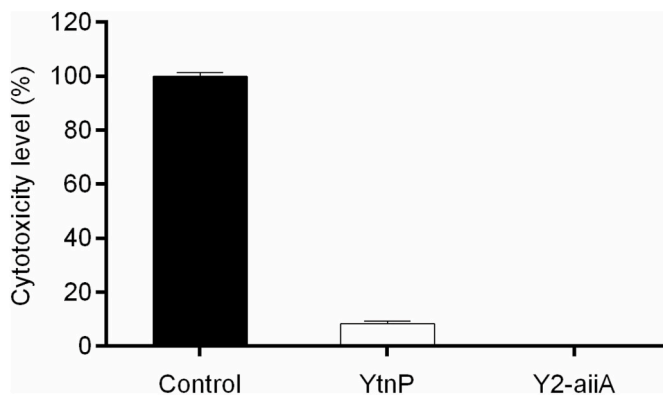
Temperature optimum of YtnP and Y2-aiiA was in accordance to MomL lactonase activity (40 °C) [21], but lower than AidB lactonase (60 °C) from *Bosea* sp [23], and AaL lactonase (58.2 °C) from the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris* [58]. However,

both lactonases retained activity on higher temperatures, especially YtnP, with 50% activity after pre-incubating at 70 °C. In terms of thermal resistance, both YtnP and Y2-aiiA lactonases displayed moderate thermostability, which was still significant, having in mind that most identified thermostable AHL lactonases were isolated from thermophilic bacteria [58,59].

Analysis of the enzymatic potential of YtnP and Y2-aiiA revealed that both lactonases exhibit a variable substrate specificity spectrum and efficient degradation of the AHL compounds used in this study. YtnP showed a higher preference for short and middle-long chain AHLs, while Y2-aiiA was efficient against both short- and long-chain AHLs, even with greater specificity towards long chain AHLs. We could assume that the distinction in their substrate specificity is due to different cellular distributions and functions. It is known that *B. cepacia* synthesizes homoserine lactones [27], so the intracellular YtnP might be involved in the self-control of own AHL signals. However, the extracellular Y2-aiiA displayed even broader substrate specificity and ability to respond to different QS signal producers in the environment. Thus, it is possible that *B. cepacia* uses this strategy to differentially modulate the relative concentration of endogenous short- and middle-long chain AHLs and the exogenous long-chain AHLs. In this manner, it could autoregulate QS within its cell, while at the same time to interfere with the QS systems of competitors within the same niche giving them competition advantage. This could also be supported by the fact that RNA transcription of *ytnP* is completely correlated with QS genes. mRNA levels of intracellular *ytnP*



**Fig. 6.** Investigation of antivirulence potential of *B. cepacia* BCC4135 lactonases using *P. aeruginosa* MMA83 clinical isolate as a model system. (A) Images captured by fluorescence microscopy exhibited the effect of YtnP and Y2-aiiA lactonases on the biofilm-forming ability of *P. aeruginosa* MMA83. Fluorescent dye SYTO9 was used for the visualization of biofilms. Scale bar represents 10  $\mu$ m. (B) The changes of relative mRNA levels of *P. aeruginosa* MMA83 QS genes after incubation with YtnP and Y2-aiiA enzymes, singularly or in combination. Genes surveyed in RT-qPCR analysis belong to three *P. aeruginosa* QS networks *las*, *rhl* and *pqs* (*las* – *lasI*, *lasR*; *rhl* – *rhlI*, *rhlR*; *pqs* – *pqsA*, *mvfR*). RT-qPCR data were normalized against the ribosomal gene *rpsL* as an internal control. The effect of *B. cepacia* BCC4135 lactonases on virulence factors elastase (C), pyocyanin (D), and rhamnolipid (E) production, measured by using appropriate assays. (F) Bacterial growth expressed as CFU/ml. No significant difference in cell growth was observed between cultures treated with *B. cepacia* BCC4135 lactonases and untreated controls. Student's *t*-test was used to compare the differences between the control and experimental groups (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 7.** Cytotoxic effect of *B. cepacia* BCC4135 recombinant lactonases on HaCaT keratinocyte cells. Cytotoxic level of YtnP and Y2-aiiA enzymes on HaCaT cells was evaluated using LDH assay. Obtained results were normalized relative to control.

decrease when QS system is not active (late stationary phase of growth), while levels of *y2-aiiA* mRNA are still increasing enabling silencing of communication among competitors. Further, *B. cepacia* does not produce long-chain HSL [29] and there is no need for broad-spectrum lactonases if they are only involved in self-regulation of their own QS network. Hence, the substrate specificity difference among these two lactonases could be considered as the clue for their biological roles. The detected growth phase-dependence of the expression level and promoter activity of BCC4135 lactonases genes could imply different metabolic activities and regulation of those lactonases in QQ/QS *B. cepacia* network. Our findings are supported by the discovery observed by Mayer and colleagues [60], who reported that the expression level of lactonases genes could be QS-independent.

The interference with QS signaling reduces and even could block the virulence factors production, leading to more successful control of bacterial infections. It is known that biofilm formation and other virulence factors production can be attenuated as a consequence of enzymatic degradation of signaling molecules [61]. Importantly, most of those researches have used *P. aeruginosa* PAO1 laboratory strain as a

model system [24,25,62] and only a few reports have described the ability to quench the QS system of clinical isolates [63]. Natural clinical isolates, especially those with multidrug- or extensively drug-resistant phenotype are more robust and have different virulence potential comparing to model system strains. In our study, YtnP and Y2-aiiA lactonases from one clinical isolate showed the potential to disrupt the QS phenotype of another clinical isolate *P. aeruginosa* MMA83, disabling its potential for biofilm formation and virulence factors production. Biofilm forming ability of *P. aeruginosa* MMA83 was significantly diminished by YtnP and Y2-aiiA lactonases, without affecting the growth of the bacteria, thus unlikely to create selective pressure for resistance development. The ability of extracellular lactonase Y2-aiiA to impair biofilm formation is in agreement with its higher substrate specificity for the AHL signal molecule responsible for initial cell adhesion and biofilm development of *P. aeruginosa* [14]. Extracellular virulence factors such as elastase, pyocyanin, and rhamnolipid are of key importance for the invasion of host tissues, initial phases of biofilm formation, and promoting virulence and therefore contribute to the overall pathogenesis [16]. The capacity of YtnP and Y2-aiiA in *P. aeruginosa* virulence attenuation could lead to complete inhibition or at least reduction of bacterial infections. The remarkable anti-QS effect of YtnP and Y2-aiiA was also confirmed on the transcriptional level. The two major affected *P. aeruginosa* QS systems *las* and *rhl* control virulence factors production and biofilm development. Furthermore, the combination of the enzymes was superior to a single enzyme application for quenching the QS circuit. In addition, the ability of YtnP and Y2-aiiA to reduce *pqs* QS system of *P. aeruginosa* is a feature revealed for the first time among QQ lactonases beside the previously described acylase and dioxygenase [64,65]. Later on, Y2-aiiA lactonase shown to be more effective in lowering the expression of all genes involved in QS network of *P. aeruginosa* MMA83. Altogether, the results obtained in our study indicate a promising therapeutic potential of these enzymes. The fact that both BCC4135 lactonases demonstrated non-cytotoxic effect on human keratinocyte cell line strongly supports their therapeutic value.

It should be mentioned that *B. cepacia* BCC4135 also possesses quorum sensing machinery. The ability of *B. cepacia* to survive in heterogeneous environments is partly attributed to quorum sensing activity [55]. QS via AHL signal molecules plays a pivotal role in governing virulence and other phenotypic features such as colonization and niche



invasion of this pathogen. Our current results have shown that *B. cepacia* BCC4135 uses CepI/R (AnoI/R) global regulatory QS system. The highest gene expression levels of AHL synthase (*anoI*) and transcriptional regulator (*anoR*) were observed at 12 h of cultivation, that correlates to the early stationary phase of bacterial growth [66]. This is in accordance with the expression level of the intracellular YtnP lactonase and its promoter activity, which strongly supports the postulation that this enzyme plays a role in the self-regulation of AHL-mediated QS. It has already been shown that the fine-tuning of AHL concentration is achieved in *P. aeruginosa* by AHL acylase activity [64], while *Agrobacterium tumefaciens* uses multicomponent QS turnover system to modulate the AHL related cellular activities [67]. Considering that the ability to clear and recycle their own QS signals by QS-signal-emitting organisms is reported among diverse bacterial species including *Shewanella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudoalteromonas byunsanensis*, and *Brucella melitensis* [60,68–70], this phenomenon may be a common mechanism for self-control of QS signal turnover. As the complete physiological role of YtnP lactonase in *B. cepacia* BCC4135 has not yet been defined, further study is required to investigate the purpose of the QQ activity in controlling the QS regulatory cascade. Having all of this in mind, we functionally characterized YtnP and Y2-aiiA lactonases of *B. cepacia* and showed their ability to interfere with *P. aeruginosa* QS circuits, lowering virulence and biofilm formation. In addition, differences in substrate specificity indicated a different biological role of these two lactonases. We could hypothesize the role of YtnP in autoregulation of QS until the late stationary phase and the role of Y2-aiiA in silencing of communication among the competitors within the same niche. This study clearly represents the potential of *B. cepacia* lactonases against *P. aeruginosa* through the silencing of its quorum sensing circuit and represents platform for development of novel antivirulence therapeutics.

#### Author contribution

Milka Malešević: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Writing - Original Draft.

Nemanja Stanisavljević: Methodology, Investigation, Formal analysis.

Katarina Novović: Methodology, Investigation, Visualization.

Natalija Polović: Data curation, Supervision, Validation.

Zorica Vasiljević: Resources, Supervision, Formal analysis.

Milan Kojić: Funding acquisition, Resources, Supervision, Validation.

Branko Jovčić: Conceptualization, Supervision, Validation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing.

All of the authors were involved in approving the final version of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### Funding

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia (Grant No. 451-03-68/2020-14/200042).

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

We are grateful to Miroslav Dinić for his help in work with HaCaT cell line.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104561>.

#### References

- [1] M.K. Trivedi, S. Patil, H. Shettigar, M. Gangwar, S. Jana, An effect of biofield treatment on multidrug-resistant *Burkholderia cepacia*: a multistep pathogen, *J. Tropical Dis.* 3 (2015), <https://doi.org/10.4172/2329-891x.1000167>.
- [2] A.M. Bressler, K.S. Kaye, J.J. LiPuma, B.D. Alexander, C.M. Moore, L.B. Reller, C. W. Woods, Risk factors for *Burkholderia cepacia* complex bacteremia among intensive care unit patients without cystic fibrosis: a case-control study, *Infect. Contr. Hosp. Epidemiol.* 28 (2007) 951–958, <https://doi.org/10.1086/519177>.
- [3] L. Eberl, B. Tummler, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation, *Int. J. Med. Microbiol.* 294 (2004) 123–131, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.022>.
- [4] U. Schwab, L.H. Abdullah, O.S. Perlmutter, D. Albert, C.W. Davis, R.R. Arnold, J. R. Yankaskas, P. Gilligan, H. Neubauer, S.H. Randell, R.C. Boucher, Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucosa, *Infect. Immun.* 82 (2014) 4729–4745, <https://doi.org/10.1128/IAI.01876-14>.
- [5] S.P. Bernier, M.L. Workentine, X. Li, N.A. Magarvey, G.A. O'Toole, M.G. Surette, Cyanide toxicity to *Burkholderia cenocepacia* is modulated by polymicrobial communities and environmental factors, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00725>.
- [6] N.E. Smalley, D. An, M.R. Parsek, J.R. Chandler, A.A. Dandekar, Quorum sensing protects *Pseudomonas aeruginosa* against cheating by other species in a laboratory coculture model, *J. Bacteriol.* 197 (2015) 3154–3159, <https://doi.org/10.1128/JB.00482-15>.
- [7] S. O'Brien, J.L. Fothergill, The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung, *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 364 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx128>.
- [8] H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett, Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! an update from the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.* 48 (2009) 1–12, <https://doi.org/10.1086/595011>.
- [9] M.W. Azam, A.U. Khan, Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*, *Drug Discov. Today* 24 (2018) 350–359, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>.
- [10] J. Lee, L. Zhang, The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, *Protein and Cell* 6 (2014) 26–41, <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.
- [11] A. Oliver, X. Mulet, C. López-Causapé, C. Juan, The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones, *Drug Resistance Updates*, 2015, pp. 41–59, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
- [12] A.K. Bhardwaj, K. Vinothkumar, Evolution of MDRs. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: a Battle with No End in Sight*, Springer, New Delhi, 2015, pp. 9–22.
- [13] C.M. Waters, B.L. Bassler, Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005) 319–346, <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>.
- [14] B. LaSarre, M.J. Federle, Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (2013) 73–111, <https://doi.org/10.1128/mbr.00046-12>.
- [15] P. Williams, K. Winzer, W.C. Chan, M. Camara, Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, *Phil. Trans. Biol. Sci.* 362 (2007) 1119–1134, <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2039>.
- [16] Q. Jiang, J. Chen, C. Yang, Y. Yin, K. Yao, Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases, *BioMed Res. Int.* 15 (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/2015978>.
- [17] A. Borges, M. Simões, Quorum sensing inhibition by marine bacteria, *Mar. Drugs* 17 (2019), <https://doi.org/10.3390/md17070427>.
- [18] C. Grandclement, M. Tannieres, S. Morera, Y. Dessaux, D. Faure, Quorum quenching: role in nature and applied developments, *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev.* 40 (2016) 86–116, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>.
- [19] K.W. Hong, C.L. Koh, C.K. Sam, W.F. Yin, K.G. Chan, Quorum quenching revisited—from signal decays to signalling confusion, *Sensors* 12 (2012) 4661–4696, <https://doi.org/10.3390/s120404661>.
- [20] P.W. Thomas, E.M. Stone, A.L. Costello, D.L. Tierney, W. Fast, The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein, *Biochemistry* 44 (2005) 7559–7569, <https://doi.org/10.1021/bi050050m>.
- [21] K. Tang, Y. Su, G. Brackman, F. Cui, Y. Zhang, X. Shi, T. Coenye, X.H. Zhang, MomL, a novel marine-derived N-Acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 774–782, <https://doi.org/10.1128/AEM.02805-14>.
- [22] X. Cai, M. Yu, H. Shan, X. Tian, Y. Zheng, C. Xue, X.H. Zhang, Characterization of a novel N-acylhomoserine lactonase RmML from *Ruegeria mobilis* YJ3, *Mar. Drugs* 16 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.3390/md16100370>.
- [23] J.W. Zhang, C.G. Xuan, C.H. Lu, S. Guo, J.F. Yu, M. Asif, W.J. Jiang, Z.G. Zhou, Z. Q. Luo, L.Q. Zhang, AidB, a novel thermostable N-Acylhomoserine lactonase from the bacterium *Bosea* sp, *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (2019), <https://doi.org/10.1128/AEM.02065-19>.

- [24] X. Fan, M. Liang, L. Wang, R. Chen, H. Li, X. Liu, Aii810, a novel cold-adapted N-acylhomoserine lactonase discovered in a metagenome, can strongly attenuate *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilm formation, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01950>.
- [25] W. Dong, J. Zhu, X. Guo, D. Kong, Q. Zhang, Y. Zhou, X. Liu, S. Zhao, Z. Ruan, Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huakui* LAM0618T and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24507-8>.
- [26] M. Torres, S. Uroz, R. Salto, L. Fauchery, E. Quesada, I. Llamas, HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–15, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01176-7>.
- [27] C. Aguilar, A. Friscina, G. Devescovi, M. Kojic, V. Venturi, Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 6456–6462, <https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6456-6462.2003>.
- [28] L. Dale, W. Ferris, K. Vandemheen, S.D. Aaron, Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (2009) 1275–1279, <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0774-9>.
- [29] P.A. Sokol, R. Malott, K. Riedel, L. Eberl, Communication systems in the genus *Burkholderia*: global regulators and targets for novel antipathogenic drugs, *Future Microbiol.* 2 (2007) 555–563, <https://doi.org/10.2217/17460913.2.5.555>.
- [30] K.G. Chan, S. Atkinson, K. Mathee, C.K. Sam, S.R. Chhabra, M. Cámara, C.L. Koh, P. Williams, Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*, *BMC Microbiol.* 11 (2011), <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-51>.
- [31] M. Malešević, F. Di Lorenzo, B. Filipić, N. Stanisavljević, K. Novović, L. Senerovic, N. Polović, A. Molinaro, M. Kojić, B. Jovčić, *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones, *Sci. Rep.* 9 (2019) 16465, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52955-3>.
- [32] K.H. McClean, M.K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S.R. Chhabra, M. Cámara, M. Daykin, J.H. Lamb, S. Swift, B.W. Bycroft, G.S. Stewart, P. Williams, Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones, *Microbiology* 14 (1997) 33703–33711, <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>.
- [33] B. Jovčić, Z. Lepšanić, V. Suljagić, G. Rackov, J. Begović, L. Topisirović, M. Kojić, Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 3929–3931, <https://doi.org/10.1128/AAC.00226-11>.
- [34] Y. Peng, H.C. Leung, S.M. Yiu, F.Y. Chin, Idba-Ud, A *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth, *Bioinformatics* 28 (2012) 14208, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>.
- [35] H. Li, R. Durbin, Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics* 26 (2010) 58995, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>.
- [36] T. Disz, S. Akhter, D. Cuevas, R. Olson, R. Overbeek, V. Vonstein, R. Stevens, R. A. Edwards, Accessing the SEED genome databases via Web services API: tools for programmers, *BMC Bioinf.* 11 (2010) 319, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-319>.
- [37] B. Liu, D.D. Zheng, Q. Jin, L.H. Chen, J. Yang, Vdb 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D687–D692, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>.
- [38] A.G. McArthur, N. Waglechner, F. Nizam, A. Yan, M.A. Azad, A.J. Baylay, K. Bhullar, M.J. Canova, G. De Pascale, L. Ejim, L. Kalan, A.M. King, K. Koteva, M. Morar, M.R. Mulvey, J.S. O'Brien, A.C. Pawlowski, L.J. Piddock, P. Spanogiannopoulos, A.D. Sutherland, I. Tang, P.L. Taylor, M. Thaker, W. Wang, M. Yan, T. Yu, G.D. Wright, The comprehensive antibiotic resistance database, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 3348–3357, <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>.
- [39] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentini, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T. J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947–2948, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- [40] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [41] J.J. Almagro Armenteros, K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby, T.N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 420–423, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- [42] H. Grönlund, T. Bergman, K. Sandstrom, G. Alvelius, R. Reininger, P. Verdino, A. Hauswirth, K. Liederot, P. Valent, S. Spitzauer, W. Keller, R. Valenta, M van Hage-Hamsten, Formation of disulfide bonds and homodimers of the major cat allergen Fel d 1 equivalent to the natural allergen by expression in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40144–40151, <https://doi.org/10.1074/jbc.M301416200>.
- [43] K. Duan, M.G. Surette, Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 4827–4836, <https://doi.org/10.1128/JB.00043-07>.
- [44] F. Massai, F. Imperi, S. Quattrucci, E. Zennaro, P. Visca, L. Leoni, A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoylhomoserine lactone quorum sensing signal, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3444–3449, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.022>.
- [45] G.Y. Mei, X.X. Yan, A. Turak, Z.Q. Luo, L.Q. Zhang, AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 4933–4942, <https://doi.org/10.1128/AEM.00477-10>.
- [46] D.W. Essar, L. Eberly, A. Hadero, I.P. Crawford, Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 884–900, <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>.
- [47] D.D. Rienzo, M. Kamalanathan, P. Martin, Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation, *Process Biochem.* 51 (2016) 820–827, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.007>.
- [48] D. Hanahan, Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557–580, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
- [49] H.P. Spaink, R.J.H. Okker, C.A. Wijffelman, E. Pees, B.J.J. Lugtenberg, Promoter in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1, *Plant Mol. Biol.* 9 (1987) 27–39, <https://doi.org/10.1007/BF00017984>.
- [50] D.H. Figurski, D.R. Helinski, Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 76 (1979) 1648–1652, <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>.
- [51] J.H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: NY, 1972.
- [52] S.E. Stachel, G. An, C. Flores, E.W. Nester, A Tn3 lacZ transposon for the random generation of  $\beta$ -galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression of, *Agrobacterium tumefaciens* EMBO J. 4 (1985) 891–898, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03715.x>.
- [53] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, *Methods* 25 (2001) 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [54] S. El-Shaer, M. Shaaban, R. Barwa, R. Hassan, Control of quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* using phenylalanine arginyl beta-naphthylamide, *J. Med. Microbiol.* 65 (2016) 1194–1204, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000327>.
- [55] J.L. Parke, D. Gurian-Sherman, Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains, *Annu. Rev. Phytopathol.* 39 (2001) 225–258, <https://doi.org/10.1146/annurev.phytop.39.1.225>.
- [56] L. Vial, A. Chapalain, M.C. Groleau, E. Déziel, The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation, *Environ. Microbiol.* 13 (2011) 1–12, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02343.x>.
- [57] P. Tedesco, M. Visone, E. Parrilli, M.L. Tutino, E. Perrin, I. Maida, R. Fani, F. Ballestrero, R. Santos, C. Pinilla, E. Di Schiavi, G. Tegos, D. de Pascale, Investigating the role of the host multidrug resistance associated protein transporter family in *Burkholderia cepacia* complex pathogenicity using a *Caenorhabditis elegans* infection model, *PLoS One* 10 (2015) 1–17, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142883>.
- [58] C. Bergonzi, M. Schwab, T. Naik, D. Daudé, E. Chabrière, M. Elias, Structural and biochemical characterization of Aal, a quorum quenching lactonase with unusual kinetic properties, *Sci. Rep.* 8 (2018) 19–21, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28988-5>.
- [59] M.J. Seo, B.S. Lee, Y.R. Pyun, H. Park, Isolation and characterization of N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus caldophililyticus* YS-8, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 1789–1795, <https://doi.org/10.1271/bbb.110322>.
- [60] C. Mayer, A. Muras, M. Romero, M. López, M. Tomás, A. Otero, Multiple quorum quenching enzymes are active in the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00310>.
- [61] S. Fetzner, Quorum quenching enzymes, *J. Biotechnol.* 201 (2015) 2–14, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.001>.
- [62] F.S.W. Ng, D.M. Wright, S.Y.K. Seah, Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of quorum sensing, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 1181–1186, <https://doi.org/10.1128/AEM.01642-10>.
- [63] A. Guendouze, L. Plener, J. Bzdrenka, P. Jacquet, B. Rémy, M. Elias, J.P. Lavigne, D. Daudé, E. Chabrière, Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors, *Front. Microbiol.* 8 (2017), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00227>.
- [64] C.F. Sio, L.G. Otten, R.H. Cool, S.P. Diggle, P.G. Braun, R. Bos, M. Daykin, M. Cámara, P. Williams, W.J. Quax, Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Infect. Immun.* 74 (2006) 1673–1682, <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1673-1682.2006>.
- [65] C. Pustelny, A. Albers, K. Büldt-Karentzopoulos, K. Parschat, S.R. Chhabra, M. Cámara, P. Williams, S. Fetzner, Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Chem. Biol.* 16 (2009) 1259–1267, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.11.013>.
- [66] V. Venturi, A. Friscina, I. Bertani, G. Devescovi, C. Aguilar, Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex, *Res. Microbiol.* 155 (2004) 238–244, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.006>.
- [67] H.B. Zhang, L.H. Wang, L.H. Zhang, Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 99 (2002) 4638–4643, <https://doi.org/10.1073/pnas.022056699>.
- [68] K. Tait, H. Williamson, S. Atkinson, P. Williams, M. Cámara, I. Joint, Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signalling, *Environ.*

- Microbiol. 11 (2009) 1792–1802, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01904.x>.
- [69] W. Huang, Y. Lin, S. Yi, P. Liu, J. Shen, Z. Shao, Z. Liu, QsdH, a novel AHL lactonase in the RND-type inner membrane of marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* strain 1A01261, PloS One 7 (2012) 1–12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046587>.
- [70] M. Terwagne, A. Mirabella, J. Lemaire, C. Deschamps, X. De Bolle, J.J. Letesson, Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*, PloS One 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082514>.