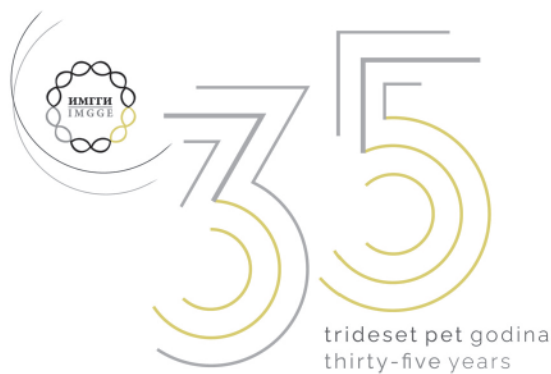


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**  
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2021.  
IMGGI • IMGGE

# Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike <b>Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur</b>	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa <b>Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski</b>	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse <b>Marko Panić</b>	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika <b>Anita Skakić, Maja Stojilković</b>	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti <b>Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević</b>	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 <b>Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević</b>	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije <b>Marina Anđelković</b>	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa <b>Jovana Komazec, Milena Ugrin</b>	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda <b>Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković</b>	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozii: geni kandidati i terapijski modaliteti <b>Vesna Spasovski, Miša Vreća</b>	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji <b>Vladimir Gašić, Nataša Tošić</b>	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka <b>Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov</b>	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi <b>Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev</b>	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti <b>Ljiljana Rakićević</b>	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres <b>Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić</b>	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <b>Milka Malešević, Branko Jovčić</b>	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra <b>Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić</b>	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

## **PREDGOVOR**

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

**Sonja Pavlović**

## IZ RECENZIJA TEMATSKOG ZBORNIKA

### Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

#### **Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

#### **Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

#### **Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu**

## Biogeni utišavači virulencije vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Milka Malešević<sup>1</sup>, Branko Jovčić<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija <sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: milkam@imgge.bg.ac.rs

### Apstrakt

*Pseudomonas aeruginosa* jedan je od najznačajnijih uzročnika unutarbolničkih infekcija čiji je terapijski tretman konvencionalnim antibioticima sve češće neefikasan usled rezistencije na antibiotike. Inovativni vidovi kontrole infekcija, poput utišavanja međucelijske komunikacije bakterija, a time i onemogućavanja virulencije i inhibicije patogenog fenotipa su stoga od izuzetnog značaja. U ovom radu biće predstavljena istraživanja koja su bazirana na prirodnom svojstvu bakterija koje dele ekološke niše da sarađuju, ali i kompetiraju, na osnovu čega su analizirane *Delftia tsuruhatensis* i *Burkholderia cepacia* koje tokom infekcija kolokalizuju sa *P. aeruginosa*. Pokazano je da *D. tsuruhatensis* 11304 proizvodi C18-HSL koji inhibira virulenciju *P. aeruginosa* i rekonstituiše osetljivost na antibiotike, a takođe je po prvi put u literaturi opisano prisustvo dihidroksi-C18-HSL u biološkim uzorcima. Opisane su i laktonaze vrste *B. cepacia* BCC4135 koje degraduju autoinducere komunikacije *P. aeruginosa* i inhibiraju ekspresiju faktora virulencije. Utvrđena je njihova supstratna specifičnost i ukazano na različitu biološku funkciju u zavisnosti od lokalizacije.

**Ključne reči:** međucelijska komunikacija bakterija, virulencija, biofilm, utišavanje međucelijske komunikacije bakterija, antivirulentni agensi, *Pseudomonas aeruginosa*

## Biogenic silencers of *Pseudomonas aeruginosa* virulence

Milka Malešević<sup>1</sup>, Branko Jovčić<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia <sup>2</sup>University of Belgrade Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

Correspondence: milkam@imgge.bg.ac.rs

### Abstract:

*Pseudomonas aeruginosa* is a leading cause of nosocomial infections, whose therapeutic treatment with conventional antibiotics is increasingly ineffective due to antibiotic resistance. Innovative approaches of infection control, such as silencing the bacterial quorum sensing system and thus virulence and pathogenic phenotype inhibition are of great importance. In this study, there will be presented research based on natural feature of bacteria that share the same ecological niche to coordinate, but also to compete, based on which *Delftia tsuruhatensis* and *Burkholderia cepacia* that colocalize with *P. aeruginosa* during infections were analysed. *D. tsuruhatensis* 11304 has been shown to produce C18-HSL which inhibits *P. aeruginosa* virulence and reconstitutes antibiotic susceptibility, and the presence of dihydroxy-C18-HSL in biological samples has also been described for the first time in the literature. *B. cepacia* BCC4135 lactonases that degrade autoinducers of *P. aeruginosa* quorum sensing system and inhibit virulence factor expression have also been reported. Their substrate specificity was determined and different biological function depending on their localization was indicated.

**Keywords:** quorum sensing, virulence, biofilm, quorum quenching, antivirulence agents, *Pseudomonas aeruginosa*

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA

*Pseudomonas aeruginosa* je Gram-negativni bacil, koga odlikuje sposobnost kolonizacije raznolikih ekoloških niša i široka rasprostranjenost u okruženju [1]. Međutim, najnoviji podaci dobijeni meta-analizom ukazuju da je prisustvo ove bakterije u okruženju najučestalije na staništima usko povezanim sa ljudskom aktivnošću [2].

*P. aeruginosa* zauzima vodeće mesto među Gram-negativnim patogenim bakterijama kao uzročnik brojnih akutnih i hroničnih infekcija, naročito kod osoba sa oslabljenim imunskim sistemom. Predstavlja glavnog uzročnika smrtnih ishoda kod pacijenata obolelih od cistične fibroze i vodeći je uzročnik unutarbolničkih infekcija [1]. Široka rasprostranjenost ovog patogena u zdravstvenim ustanovama omogućena je zahvaljujući njegovoj mogućnosti transmisije sa pacijenta na pacijenta, sposobnosti dugotrajnog opstanka na živim i neživim površinama, kao i otpornosti na dezinficijense [3]. Smatra se da je za opstanak *P. aeruginosa* u različitim staništima naročito zaslužna izuzetna plastičnost genoma i sposobnost usvajanja stranih gena. Za patogenezu pseudomonasne infekcije odgovorni su brojni mehanizmi rezistencije na antibiotike kao i arsenal faktora virulencije. Usled sve veće prevalencije rezistencije i neefikasnosti antibakterijskih agenasa koji se koriste u tretmanu infekcija izazvanih ovom bakterijom, vrsta *P. aeruginosa* uvrštena je na listu ESKAPE patogena (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp.), koji predstavljaju najveću opasnost po javno zdravlje [4]. Značaj ove bakterijske vrste potvrdila je Svetska zdravstvena organizacija 2017. godine kada je *P. aeruginosa* pozicionirala na listu od 12 patogena za koje je hitno potreban razvoj novih terapeutika [4].

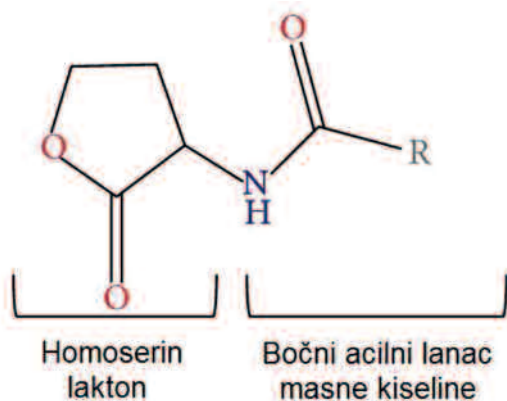
Mehanizmi rezistencije na antibiotike kod *P. aeruginosa* mogu biti urođeni, stečeni i adaptivni. Na osnovu širine spektra rezistencije na antibiotike, izolati *P. aeruginosa* svrstani su u dve grupe: višestruko rezistentni (eng. *multi-drug resistant*, MDR) i ekstremno rezistentni (eng. *extensively drug-resistant*, XDR). Prema podacima Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti 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 [5].

## FAKTORI VIRULENCIJE VRSTE *P. AERUGINOSA*

Produkcija faktora virulencije predstavlja veoma važnu strategiju preživljavanja patogena, koja im omogućava odbranu od imunskog sistema domaćina i napredovanje patogeneze, posebno u ranim fazama kolonizacije domaćina i akutne infekcije [1]. U osnovi patogenosti *P. aeruginosa* leže brojni faktori virulencije, koji se na osnovu ćelijske lokalizacije mogu podeliti na: faktore virulencije vezane za površinu ćelije; faktore koji se oslobađaju iz ćelije i različiti tipovi sekretornih sistema. Međućelijska komunikacija bakterija vrši modulaciju signala iz spoljašnje sredine i reguliše produkciju faktora virulencije, dok je formiranje biofilma najkompleksniji i najznačajniji virulentni faktor zato što integriše sve preostale faktore u jednu celinu.

## MEĐUĆELIJSKA KOMUNIKACIJA BAKTERIJA

Međućelijska komunikacija bakterija odnosno *quorum sensing* (QS) predstavlja obrazac ponašanja zasnovan na gustini bakterijske populacije koji koriste jednoćelijski organizmi u cilju prilagođavanja uslovima životne sredine, u svrhu međusobne kompeticije kao i interakcije sa višećelijskim organizmima [6]. Signalni molekuli QS sistema-autoinduceri (AI) ostvaruju dvostruku ulogu: vezivanjem za receptore aktiviraju ekspresiju ciljnih gena i produkciju novih AI, čime se ostvaruje pozitivna povratna sprega koja omogućava sinhrono ponašanje ćelija u bakterijskoj populaciji.



Slika 1. Struktura *N*-acil-homoserin laktonea.

Gram-negativne proteobakterije koriste hemijske signalne molekule *N*-acil-homoserin laktone (AHL) u svrhu međućelijske komunikacije. Strukturu AHL čini laktonski prsten za koji je amidnom vezom bočno vezan acilni lanac dužine od 4 do 20 C atoma (Slika 1). Acilni lanac može nositi nesaturisane dvostruke veze ili posedovati modifikacije na C3 atomu (okso ili hidroksi supstituent) [7]. Po dostizanju kritične koncentracije AHL se veže za citoplazmatski transkripcioni regulator (receptor, R), pri čemu se uspostavlja kompleks AI/R. Ovaj kompleks potom, kod individualnih ćelija koje čine bakterijsku populaciju, omogućava simultanu aktivaciju transkripcije gena pod kontrolom QS sistema [8]. AHLom posredovan QS sistem bakterije prevashodno koriste za intraspecijsku komunikaciju. Osim što jedinke iste bakterijske vrste međusobno razmenjuju hemijske signale, bakterije imaju sposobnost "prisluškivanja" komunikacije dru-



## EKSTRACELULARNI FAKTORI VIRULENCIJE

**Elastaze.** Sposobnost *P. aeruginosa* da razgradi elastin smatra se glavnom odrednicom patogeneze tokom akutne infekcije. Proces razgradnje elastina, gradivne komponente tkiva pluća, odvija se usklađenom aktivnošću enzima LasA i LasB elastaze [10]. Sintaza ovih enzima pod kontrolom je *las* QS sistema. Ovi enzimi, osim razgradnje elastina, imaju takođe sposobnost razgradnje kolagena i proteina surfaktanta prisutnih na površini plućnog epitela [14]. Kao posledica elastazne aktivnosti, dolazi do narušavanja integriteta epitelne barijere, slabljenja imunskog sistema domaćina, kao i smanjenja mogućnosti zarastanja rana.

**Piocijanin** je plavozeleni pigment iz grupe fenazina. Njegova sinteza je pod kontrolom *pqs* QS sistema, a transport u lokalno okruženje posredovan je sekrecionim sistemom tipa II [11,12]. Produkcija ovog sekundarnog metabolita specifična je za *P. aeruginosa* i jedan je od glavnih mehanizama kojim ova bakterija ostvaruje citotoksičan efekat na ćelije domaćina izazivanjem oksidativnog stresa. Utvrđeno je, takođe, da je ozbiljnost pseudomonasne infekcije u direktnoj sprezi sa koncentracijom piocijanina u sputumu pacijenata obolelih od cistične fibroze [15].

**Ramnolipidi** predstavljaju termostabilne glikolipide hemolizine, a njihova sinteza odvija se pod kontrolom *las* i *rhl* sistema međućelijske komunikacije. Ovi biosurfaktanti ostvaruju hemolitičku ulogu koja uključuje razgradnju lipida, narušavanje funkcije cilijarnog plućnog epitela i nekrozu ćelija domaćina, i na taj način daju doprinos invaziji tkiva domaćina [16]. Ramnolipidi, takođe, ostvaruju izuzetno važnu ulogu u nekoliko faza formiranja biofilma kao što su formiranje mikrokolonija, održavanje strukture biofilma i njegovo rasejavanje [17].

## BIOFILM

Tokom istorije mikrobiologije, mikroorganizmi su prevashodno smatrani planktonskim, slobodnoživućim organizmima. 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. Biofilm po definiciji predstavlja visoko organizovanu zajednicu mikroorganizama pričvršćenih za površinu i uronjenih u ekstraćelijski matriks koji sami proizvode [18]. Može se formirati kako na živim, tako i na neživim površinama. 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. U formiranju biofilma može učestvovati jedna ili veći broj bakterijskih vrsta. Procenjuje se da dentalni biofilm sadrži preko 500 različitih vrsta bakterija. Nasuprot tome, u podmaklom stadijumu bolesti, u plućima pacijenata obolelih od cistične fibroze biofilm formira jedino *P. aeruginosa* [1].

Zajednice mikroorganizama u biofilmu razlikuju se od slobodnih ćelija na osnovu brzine rasta i ekspresije gena, usled toga što život u ovakvoj mikrosredini odlikuje povećana osmolarnost, ograničena dostupnost hranljivih materija i znatno veća gustina raznolikih bakterijskih vrsta. 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 kompeticije između različitih mikroorganizama. Međućelijska komunikacija je znatno olakšana, te biofilmovi predstavljaju idealnu nišu za razmenu informacija i sinhrono ponašanje. Smatra se da su bakterije u biofilmu do hiljadu puta tolerantnije na delovanje antibiotika u odnosu na planktonsku formu [18]. Procesi koji se odvijaju unutar ovih složenih struktura su pod direktnom kontrolom QS sistema.

Sposobnost formiranja biofilma predstavlja jednu od najznačajnijih virulentnih karakteristika *P. aeruginosa* i zašlužan je za uspostavljanje hroničnih infekcija, i samim tim može direktno uticati na progresiju bolesti i dugotrajnu



Slika 3. Faze formiranja biofilma vrste *P. aeruginosa*.



perzistenciju [1]. Zahvaljujući tome, *P. aeruginosa* dominira u polimikrobnoj zajednici starijih osoba obolelih od cistične fibroze, istiskujući ostale članove te zajednice. Ova bakterijska vrsta uzeta je kao model sistem za proučavanje biofilмова kod Gram-negativnih bakterija. Formiranje biofilma je precizno regulisan, višestepeni proces koji čine sledeći događaji: (1) adsorpcija molekula, vezivanje bakterija za površinu (reverzibilno i ireverzibilno) i oslobađanje ekstracelularnih supstanci; (2) formiranje mikrokolonija i sazrevanje biofilma i (3) rasejavanje (disperzija) (Slika 3).

## ANTIVIRULENTNA TERAPIJA - TERAPIJA ZASNOVANA NA INHIBICIJI PATOGENOSTI BAKTERIJA

Iako se otkriće antibiotika smatra jednim od najznačajnijih dostignuća na polju medicine 20. veka, zlatna era antibiotika okončana je nekontrolisanom pojavom izolata rezistentnih na sve trenutno dostupne klase antibiotika među klinički značajnim bakterijskim vrstama [19]. Kao posledica toga, lečenje pojedinih infekcija postaje vrlo ograničeno ili čak onemogućeno, javljaju se i zarazne bolesti, čiji su uzročnici bakterije, koje su gotovo neizlečive konvencionalnom antibiotskom terapijom. U cilju poboljšanja efikasnosti antibiotika, pribegava se povećavanju njihovih doza ili primeni kombinovane antibiotske terapije, koja ima značajne posledice po zdravlje ljudi. Međutim, najviše zabrinjava činjenica da poslednjih decenija u kliničku praksu nije uvedena nijedna značajnija nova klasa antibiotika, te su svi trenutno dostupni antibiotici na tržištu derivati starijih generacija [19]. Zbog toga postoji urgentna potreba za razvojem i primenom novih pristupa koji bi obezbedili održivu i dugoročnu efikasnost u borbi protiv rezistentnih patogenih bakterija.

Tradicionalni antibiotici ciljaju vitalne ćelijske procese visoko konzervisane među bakterijama i time nameću snažan selektivni pritisak, što vodi ka razvoju mehanizama rezistencije, i vrlo često ka oštećenju i/ili disbiozi mikrobiote domaćina [20]. Jedan od predloženih novih pristupa cilja ćelijske procese bakterija odgovorne za virulenciju i patogenost, te je ovaj pristup označen kao "antivirulentna" ili "antipatogena" terapija. Prednost ovog pristupa ogleda se u tome što on vodi ka znatnom smanjenju selektivnog pritiska i samim tim manjoj mogućnosti razvoja rezistencije, te stoga ima značajnu prednost u pogledu kontrole infekcija. S obzirom da su antivirulentni agensi specifični za patogene, očekuje se da će imati zanemariv efekat na komensalne bakterije. Glavnu metu antivirulentne terapije predstavlja QS sistem koji koordiniše produkciju faktora virulencije i invaziju tkiva domaćina, te samim tim leži u osnovi patogenosti.

Razvoj antivirulentne terapije omogućilo je otkriće fenomena utišavanja međućelijske komunikacije bakterija. Ovaj fenomen nazvan *quorum quenching* (QQ) prvi put je opisan 2000. godine kada je identifikovan enzim AiiA laktoneaza [21]. Do danas su identifikovani brojni QQ mehanizmi koji se zasnivaju na prirodni molekula, načinu delovanja i ciljnim metama [21]. Na osnovu svoje prirode QQ molekuli su podeljeni na inhibitore *quorum sensing*-a (mali molekuli neproteinske prirode, QSI) i *quorum quenching* enzime (makromolekuli proteinske prirode).

## MALI MOLEKULI UTIŠIVAČI MEĐUĆELIJSKE KOMUNIKACIJE BAKTERIJA

Mali molekuli utišivači međućelijske komunikacije bakterija (QSI) čine veoma raznoliku grupu molekula koje odlikuje sposobnost inaktivacije autoinducer sintaza i kompetitivnog vezivanja/strukturnih modifikacija receptora. U literaturi su opisani brojni QSI molekuli poreklom iz veoma različitih organizama uljučujući biljke, životinje, gljive i mikroorganizme [21]. Osim prirodnih, opisani su i brojni sintetički QSI molekuli [22]. Premda mnogi organizmi i ekstrakti pokazuju QSI aktivnost, aktivna jedinjenja su u potpunosti okarakterisana u nekolicini slučajeva. Značajno je naglasiti da je biohemijska priroda QSI veoma raznolika, i osim strukturnih analoga signalnih molekula, koji najčešće deluju kao kompetitivni inhibitori, ne postoji direktna korelacija između hemijske strukture ili funkcionalne grupe QSI i njihovih ciljnih aktera iz QS sistema [21]. Na osnovu mehanizma delovanja, QSI su podeljeni u tri grupe:

**Inhibitori sinteze signalnih molekula** sprečavaju produkciju signalnih molekula posredstvom inhibicije sinteze prekursora ili same aktivnosti autoinducer sintaze. Identifikovana je nova klasa PqsD inhibitora koji značajno smanjuje koncentraciju PQS prekursora i blokira formiranje biofilma vrste *P. aeruginosa* [23].

**Inhibitori transporta i razmene QS signalnih molekula** doprinose smanjenju ili potpunom blokiranju transporta QS signalnih molekula. Neki od opisanih molekula imaju ulogu sekvestera autoinducera. Ustanovljeno je da antitela ostvaruju vrlo efikasno delovanje u sekvestraciji QS signala kod *S. aureus* i 3-okso-C12-HSL kod *P. aeruginosa* [24].

**Inhibitori percepcije QS signala** sprečavaju vezivanje QS signala za receptor i/ili modifikuju konformaciju kompleksa signal-receptor, blokirajući njegovu dimerizaciju ili interakciju sa odgovarajućim DNK regionom. Najveći broj opisanih QSI molekula predstavljaju antagoniste QS signala. Različiti prirodni i sintetički analozi AHL molekula poput tiolaktona, laktama i halogenih furanona blokiraju *rhl* QS sistem *P. aeruginosa* [21]. Ustanovljeno je, takođe, da farnezol poreklom iz *Candida albicans* inhibira produkciju PQS signalnog molekula vezujući se za PqsR i uzrokujući konformacionu modifikaciju receptora čime se sprečava njegovo vezivanje za promotorsku sekvencu *pqsA* gena [25].

## ENZIMI UTIŠIVAČI MEĐUĆELIJSKE KOMUNIKACIJE

Premda prema poreklu mogu biti veoma raznoliki, najveći broj opisanih QQ enzima izolovan je iz bakterija [26]. Iako ovi enzimi potiču od QS-emitujućih i QS-neemitujućih mikroorganizama, 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*). QQ enzimi su na osnovu mehanizma degradacije AHL signala kategorisani u tri grupe (Slika 4):

Laktonaze koje katalizuju otvaranje laktonskog prstena;

Acilaze koje hidrolizuju amidnu vezu, pri čemu dolazi do razdvajanja acilnog lanca (masne kiseline) od laktonskog prstena;

Oksidoreduktaze koje vrše oksidaciju/redukciju acilnog lanca.

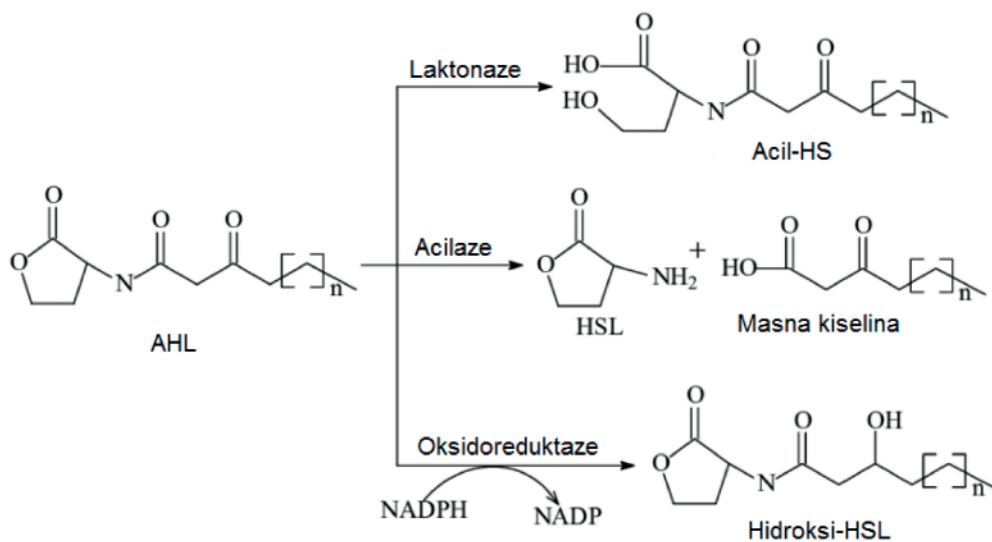
Ustanovljeno je da pojedini mikroorganizmi ne koriste QQ enzime isključivo kao deo odbrambene strategije protiv svojih kompetitora, već upotrebljavaju AHL i produkte njihove degradacije kao izvor ugljenika i azota za rast. Soj *P. aeruginosa* PAO1 i njemu blisko srodne pseudomonade degraduju AHL dugog acilnog lanca (duže od 8 C atoma) koje potom koriste kao izvor energije [27].

Budući da pripadnici Gram-pozitivnih bakterija ne poseduju AHL-zavisan QS sistem, ekološka uloga QQ enzima poreklom iz *Bacillus* vrsta za sada nije u potpunosti razjašnjena [26]. Pretpostavlja se da ovi enzimi pre imaju ulogu u detoksifikaciji AHL nego u njihovoj degradaciji, budući da je ova grupa mikroorganizama senzitivna na AHL. Stoga bi AHL za *Bacillus* mogli imati svojstvo antibiotika, dok bi laktonaze predstavljale determinante rezistencije na antibiotike [21].

Laktonaze su metaloproteini koji hidrolizuju estarsku vezu laktonskog prstena. Mehanizam delovanja AHL laktonaza je reverzibilan, a s obzirom da je identičan procesu pH-posredovane laktonolize, acidifikacija dovodi do ponovne ciklizacije laktona. Laktonaze mogu imati široku supstratnu specifičnost, s obzirom da je meta ovih enzima-laktonski prsten identičan kod svih AHL molekula [28]. Do danas je opisano preko 30 različitih tipova AHL laktonaza. Aminokiselinska sekvenca i struktura laktonaza veoma je raznovrsna, stoga su ovi enzimi svrstani u četiri superfamilije proteina: metalo- $\beta$ -laktamaze, paraoksonaze, fosfortriesteraze i  $\alpha/\beta$ -hidrolaze [26]. Bez obzira na veoma malu identičnost na aminokiselinskom nivou među različitim podgrupama, sve AHL laktonaze članovi superfamilije metalo- $\beta$ -laktamaza poseduju visoko konzervisan HXHXDH cink-vezujući motiv neophodan za degradaciju signalnih molekula.

AHL laktonaze kao što su AiiA (poreklom iz *Bacillus* sp.), AttM (*Agrobacterium tumefaciens*), AidB (*Bosea* sp.), AidC (*Chryseobacterium* sp.), MomL (*Muricauda olearia*) i RmmL (*Ruegeria mobilis*) poseduju vrlo široku supstratnu specifičnost u pogledu dužine bočnog acilnog lanca AHL molekula [29,30], ali se razlikuju po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama. Sposobnost ovih enzima da degraduju AHL i na taj način spreče formiranje biofilma i produkciju faktora virulencije *P. aeruginosa* potvrđena je brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama [29,31,32]. Imajući u vidu navedena svojstva, AHL laktonaze su selektovane kao dobri kandidati za antivirulentnu terapiju.

Nasuprot laktonazama, acilaze ireverzibilno hidrolizuju amidne veze između acilnog lanca i laktonskog prstena AHL, pri čemu nastaju masna kiselina i homoserin lakton. Ireverzibilna hidroliza smatra se dobrim svojstvom sa



Slika 4. Mehanizam delovanja enzima utišivača međucelijske komunikacije.

biotehnoškog aspekta, jer ne postoji mogućnost regeneracije funkcionalnog AHL. Supstratna specifičnost acilaza bazirana je na dužini acilnog lanca AHL kao i prisustvu strukturnih modifikacija na C3 atomu [28]. Do danas su identifikovane acilaze poreklom iz *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* i *Ochrobactrum* vrsta [26]. Kao i laktoneze, i ova grupa enzima ostvaruje značajan antivirulentni potencijal.

Enzimi pripadnici klase oksidoreduktaza ne vrše degradaciju AHL molekula, već ih modifikuju u neaktivan oblik oksidacijom ili redukcijom acilnog lanca. Sintaza oksidoreduktaza smatra se protektivnim mehanizmom kod pojedinih bakterijskih vrsta. Ustanovljeno je da BpiB09 oksidoreduktaza inaktivira 3-okso-C12-HSL, smanjujući produkciju pio-cijanina, pokretljivost i formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 [33].

## PRIMENA MOLEKULA UTIŠIVAČA MEĐUĆELIJSKE KOMUNIKACIJE

Strategija utišavanja međućelijske komunikacije bakterija dala je značajne rezultate u biotehnologiji uključujući borbu protiv biljnih patogena, u akvakulturi, u bioreaktorima korišćenim za prečišćavanje otpadnih voda kao i u medicinske svrhe. Kada je u pitanju primena u medicini, QQ molekuli su našli važno mesto prilikom izrade novih generacija medicinskih uređaja poput ortopedskih implanata, kontaktnih sočiva, zavoja i katetera [22].

Mada se mogu primenjivati pojedinačno, QQ molekuli su najbolje efekte dali kao deo kombinovane terapije u lečenju infekcija izazvanih kliničkim patogenima. Primena antivirulentnih agenasa u kombinaciji sa antibioticima pokazala se kao trenutno najefikasniji pristup u borbi protiv bolesti izazvanih bakterijama. Brojne studije povrdile su značaj sinergističkog delovanja antibiotika i antivirulentnih agenasa u smanjenju primenjene doze antibiotika i poboljšanja njihove efikasnosti [34,35].

U poslednje dve decenije istraživanja iz oblasti antivirulentne terapije dala su veoma značajne rezultate. Identifikovane su brojne nove mete antivirulentne terapije zasnovane na prirodnom fenomenu utišavanja QS sistema i uspešno su uspostavljene strategije pronalaska novih terapeutika. Imajući u vidu da je *P. aeruginosa* jedan je od najznačajnijih oportunističkih humanih patogena, čiji je tretman vrlo otežan usled ograničenih terapijskih mogućnosti, aktuelna istraživanja usmerena su ka alternativnim terapijskim pristupima i primeni bakteriofaga, vakcina i molekula koji za cilj imaju utišavanje međućelijske komunikacije.

## ULOGA BAKTERIJSKIH SOCIJALNIH INTERAKCIJA U USPOSTAVLJANJU NJIHOVOG PATOGENOG POTENCIJALA

Socijalne interakcije između različitih mikroorganizama unutar polimikrobnih zajednica su od izuzetne važnosti za oblikovanje patogenosti bakterija. Ove interakcije mogu ostvariti uticaj 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 u svrhu osvajanja različitih ekoloških niša. Itekako je poznato da sekundarni metaboliti *P. aeruginosa* ostvaruju uticaj na susedne mikroorganizme. Kao odgovor na prisustvo *P. aeruginosa*, prostorno bliski mikroorganizmi primenjuju raznolike odbrambene mehanizme. Jedna od tih odbrambenih strategija je utišavanje međućelijske komunikacije ovog patogena. Do danas su opisani brojni utišivači QS sistema. Ono što je, međutim, ostalo manje poznato jeste, kako mikroorganizmi koji tokom infekcije domaćina kolonizuju ista tkiva i organe kao i *P. aeruginosa*, kompetiraju za ograničene resurse posredstvom utišavanja njegove međućelijske komunikacije. Stoga je ideja ovog istraživanja bila potraga za novim, potencijalno efikasnim QQ molekulima poreklom od 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 studija svoja istraživanja bazirala je na upotrebi laboratorijskih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i PA14 kao model sistema [31,32], dok su podaci o utišavanju QS sistema kliničkih izolata *P. aeruginosa* veoma oskudni. S tim u vezi, jedan od zadataka ovog istraživanja bio da se antivirulentni potencijal novih QSI/ QQ molekula ispita na kliničkom izolatu *P. aeruginosa* MMA83, soju od izuzetnog kliničkog značaja, čiji je višestruko rezistentni fenotip u korelaciji sa teškim ishodom infekcije [36].

U okviru naših istraživanja sprovedenih u poslednjih pet godina [37,38] analizirano je prisustvo QQ fenotipa poreklom iz Gram-negativnih kliničkih izolata uzorkovanih na teritoriji grada Beograda. Analizirano je ukupno 633 kliničkih izolata, pripadnika 11 rodova. Prilikom selekcije, od 19 sojeva sa QQ fenotipom, izdvojila su se dva izolata *Delftia tsuruhatensis* 11304 i *Burkholderia cepacia* BCC4135 koja su na osnovu inicijalne analize pokazala najbolje rezultate. Pored toga, još jedan od kriterijuma za odabir ovih izolata za detaljnu karakterizaciju bila je i različita priroda QQ molekula koje produkuju ovi sojevi.

## DELFTIA TSURUHATENSIS 11304 JE IZVOR QSI MOLEKULA

Iako je *Delftia tsuruhatensis* prvobitno okarakterisana kao značajan bioremedijator [39], najnovija istraživanja ukazuju na značaj ove bakterijske vrste kao patogena odgovornog za povećano izazivanje infekcija kod ljudi, prevažno u unutarbolničkim uslovima [40]. Budući da su literaturni podaci o *D. tsuruhatensis* veoma oskudni, nemoguće je sa sigurnošću govoriti o poreklu *D. tsuruhatensis* 11304 soja analiziranom u našoj studiji [37], bilo da je on poreklom iz bolničke sredine, ili je u pitanju sredinski izolat koji je u bolničku sredinu dospelo posredstvom pacijenta. Ono što ukazuje na mogući virulentni fenotip i sam klinički značaj ovog izolata jeste prisustvo genetičkih determinanti za sintezu faktora virulencije i rezistencije na antibiotike, što bi moglo doprineti sveukupnom patogenom potencijalu ovog soja i pružiti uvid u genetičku osnovu patogenosti *D. tsuruhatensis* uopšte.

Inicijalnom analizom ustanovljeno je da klinički izolat *D. tsuruhatensis* 11304 produkuje utišivače QS sistema ne-proteinske prirode, stoga je ideja ovog istraživanja bila identifikovati molekul(e) koji leže u osnovi njegove QSI aktivnosti. Ukupni etil-acetatni ekstrakt ostvario je značajno utišavanje QS sistema višestruko rezistentnog kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, redukujući njegov virulentni fenotip kroz inhibiciju formiranja biofilma kao i smanjenje produkcije ekstracelularnih faktora virulencije.

Sposobnost *P. aeruginosa* da formira biofilm omogućava ovom patogenu uspešnu kolonizaciju, usled značajne tolerancije na antibiotike i otpornosti na imunski sistem domaćina. Stoga formiranje biofilma na različitim površinama služi kao značajan izvor infekcije. Smatra se da je oko 80% bakterijskih infekcija kod ljudi nastalo kao posledica sposobnosti bakterija da formiraju biofilme [18]. Stoga su predložena tri nebaktericidna pristupa u borbi protiv patogenih bakterija koje imaju sposobnost formiranja biofilma: (1) sprečavanje vezivanja bakterija za površinu, (2) uticaj na arhitekturu biofilma radi poboljšanja prodora antimikrobnih lekova, i (3) ometanje procesa sazrevanja biofilma i/ili indukcije njegove degradacije i rasejavanja [18]. Formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83 u značajnoj meri je smanjeno tretmanom 11304 QSI ekstrakta, a da pritom sam ekstrakt nije uticao na rast bakterijskih ćelija. Redukcija sposobnosti formiranja biofilma posredstvom QSI ekstrakta ostvarena je na dozno-zavisani način, i u skladu je sa dosadašnjim literaturnim podacima vezanim za primenu drugih QSI ekstrakata [41]. Dekompozicija biofilma ima veliki značaj sa terapijskog 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. Međutim, narušavanje strukture već formiranog biofilma nije postignuto primenom 11304 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 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 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. Do sada je literaturno potvrđeno da analozi C4-HSL poreklom iz *Rhizobium* sp. NAO1 smanjuju produkciju elastaza i siderofora, dok ekstrakt rizosferne biljke *S. maltophilia* sprečava pokretljivost i produkciju piocijanina kod *P. aeruginosa* [41,42]. Ustanovljen je dozno-zavisani efekat 11304 QSI ekstrakta na produkciju elastaza, piocijanina i ramnolipida *P. aeruginosa* MMA83. Antivirulentni efekat 11304 ekstrakta potvrđen je i kroz značajno smanjenje ekspresije autoinducer sintaze i transkripcionog aktivatora analiziranih QS sistema- *las*, *rhl* i *pqs*. Budući da ovaj ekstrakt dovodi do promena na nivou transkripcije, jedan od pretpostavljenih mehanizama delovanja bioaktivnih molekula iz ekstrakta je posredstvom njihove antagonističke aktivnosti. To znači da bioaktivni molekuli sprečavaju vezivanje QS signala za receptor i/ili menjaju konformaciju kompleksa signal-receptor, blokirajući njegovu dimerizaciju i interakciju sa odgovarajućim DNK regionom ili RNK polimerazom.

Uzevši u obzir da klinički izolati *P. aeruginosa* veoma često poseduju višestruko rezistentni ili čak ekstremno rezistentni fenotip, novi pristup u kliničkoj praksi prilikom lečenja infekcija izazvanih ovakvim sojevima bi mogao 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 antivirulentnih agenasa ima za cilj smanjenje primenjene doze antibiotika i povećanje njegove efikasnosti [9]. Utvrđeno je da primena QSI inhibitora furanona i galijuma u kombinaciji sa klinički relevantnim antibioticima kolistinom, meropenemom, ciprofloksacinom i tobramicinom može dovesti do inhibicije rasta kod većine klonova *P. aeruginosa* rezistentnih na antibiotike [43]. Značaj primene QS inhibitora u smanjenju rezistencije *P. aeruginosa* PAO1 kroz sinergistički efekat sa klinički relevantnim antibioticima dokumentovan je u još nekoliko slučajeva [44,45]. Osetljivost višestruko rezistentnog kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 na meropenem i gentamicin znatno je povećana kroz sinergističko delovanje 11304 QSI ekstrakta

sa primenjenim antibioticima, ukazujući da bi aktivne komponente iz ekstrakta mogle imati primenu u kombinovanoj terapiji prilikom tretmana infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa*.

U okviru ove studije ustanovljeno je da sastav 11304 QSI ekstrakta čine *N*-acil-homoserin laktoni sa dužinom bočnog acilnog lanca od 12 do 18 C atoma, pri čemu je najdominantnije zastupljen *N*-oktadekanoil-homoserin lakton (C18-HSL). Po prvi put je, takođe, identifikovan dihidroksi-C18-HSL prirodnog porekla. Činjenica da komercijalni C18-HSL redukuje ekspresiju *lasI* QS gena i produkciju piocijanina, ukazuje na njegov uticaj na virulentni potencijal *P. aeruginosa* MMA83. Ovim otkrićem potvrđena su prethodna istraživanja koja pokazuju da kod određenih bakterijskih vrsta AHL dugog lanca interferiraju sa QS sistemom posredovanim AHLom kratkog lanca. Poznato je da se AHL dugog lanca (C12-HSL i C14-HSL) vezuju sa istim afinitetom za receptor kao i C6-HSL, ali imaju antagonističko dejstvo, zato što indukuju konformacionu modifikaciju receptora, i na taj način sprečavaju njegovu interakciju sa RNK polimerazom onemogućavajući aktivaciju transkripcije [46]. Imajući ovo u vidu, postoji osnova za pretpostavku da AHL dugog lanca poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta 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 [47]. Takođe, postoji nalazi koji tvrde da je dužina bočnog acilnog lanca jedna od ključnih odrednica u ostvarivanju antagonističkog delovanja sintetičkih AHL prilikom korišćenja *Agrobacterium tumefaciens* kao model sistema [48]. Međutim, ostvareni antivirulentni efekat nije moguće pripisati samo C18-HSL, već orkestriranoj aktivnosti nekoliko aktivnih molekula iz 11304 QSI ekstrakta.

### **BURKHOLDERIA CEPACIA BCC4135 OSTVARUJE ANTIVIRULENTNU AKTIVNOST POSREDSTVOM QQ LAKTONAZA**

Za opstanak *B. cepacia* u bolničkoj sredini naročito je zaslužna izuzetna otpornost predstavnika ove bakterijske vrste na klinički značajne antibiotike i dezinficijense, kao i njihova visokoeфикасна transmisija između pacijenata, naročito kod obolelih od cistične fibroze. Klinički ishod kolonizacije i infekcije izazvane *Burkholderia* vrstama kod pacijenata sa cističnom fibrozom značajno varira i može se manifestovati kroz tranzitornu kolonizaciju, dugoročnu hroničnu infekciju ili brzo pogoršanje kliničke slike, što može voditi ka pojavi ozloglašenog "cepacia sindroma" [49]. Soj *B. cepacia* BCC4135 koji je bio predmet proučavanja naše studije [38] 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 svojstva adaptacije ovog soja na bolničku sredinu i domaćina [50].

Odnos kliničkih izolata *B. cepacia* sa drugim patogenim vrstama, naročito *P. aeruginosa* je vrlo kompleksan. S obzirom da su ova dva patogena najznačajniji uzročnici infekcija kod obolelih od cistične fibroze, primećeno je da koagregiraju u plućima izazivajući teške respiratorne bolesti [51]. Utvrđeno je, takođe, da pripadnici *Burkholderia* vrsta posredstvom QS sistema mogu ostvariti komunikaciju sa *P. aeruginosa* [52]. Uzevši u obzir da *P. aeruginosa* dominira u polimikrobnoj zajednici kod starijih osoba obolelih od cistične fibroze, jasno je da ovaj patogen koristi raznolike mehanizme za kolonizaciju tkiva i opstanak u disajnim putevima domaćina. Stoga, susedni mikroorganizmi reaguju aktivirajući svoje odbrambene sisteme. *B. cepacia*, drugi značajan kolonizator pluća kod obolelih od cistične fibroze koristi kooperativne i kompetitivne mehanizme kako bi se izborila za opstanak u zajednici sa *P. aeruginosa*. Poznato je da članovi *Burkholderia* vrsta formiraju biofilm sa *P. aeruginosa* tako što uspostavljaju kompleksnu mrežu interakcija koja čak dovodi do razmene genetičkog materijala [51]. Međutim, u literaturi su češće opisani primeri kompetitivnog delovanja ova dva patogena. Dosadašnja istraživanja ukazuju da populacija *Burkholderia* vrsta učestalo vrši invaziju populacije *P. aeruginosa* [53] i obrnuto [54]. Uzevši za osnovu ove prirodne fenomene, sekundarni metaboliti koje proizvode prirodni kompetitori iskorišćeni su za razvoj novih terapeutika kako bi se ciljali specifični uzročnici infekcija. U skladu sa time, polazna pretpostavka bila je da tokom infekcije *B. cepacia* opstaje u zajedničkoj niši sa *P. aeruginosa* tako što utištava QS sistem svog protivnika. U okviru naše studije identifikovane su dve QQ laktonaze (YtnP i Y2-aiiA) poreklom iz soja BCC4135 sa obećavajućim antivirulentnim potencijalom. Kao i većina AHL laktonaza, YtnP i Y2-aiiA pripadaju superfamiliji metalo-β-laktamaza i poseduju visoko konzervirani HXHXDH cink-vezujući motiv u aktivnom mestu. YtnP i Y2-aiiA dele oko 40% identičnosti aminokiselinske sekvence sa filogenetski najbližim AHL laktonazama, što potvrđuje veliki diverzitet ove grupe enzima [21]. Na osnovu predikcione analize utvrđeno je da bi Y2-aiiA mogla biti ekstracelularni enzim usled prisustva signalne sekvence, dok je za YtnP pretpostavljena unutarćelijska lokalizacija.

Termostabilnost se smatra jednim 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 [30]. Temperaturni optimum YtnP i Y2-aiiA rekombinantnih enzima iznosi 40°C i 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. 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 [55].

Ispitivanjem enzimskog potencijala YtnP i Y2-aiiA laktonaza utvrđeno je da, u pogledu dužine bočnog acilnog lanca AHL, obe laktonaze pokazuju širok spektar supstratne specifičnosti za AHL molekule. YtnP enzim pokazao je veću specifičnost za AHL kratkih i srednje dugih bočnih acilnih lanaca, dok je Y2-aiiA enzim pokazao značajnu efikasnost u degradaciji AHL i kratkih i dugih acilnih lanaca, sa većom specifičnošću za AHL dugog lanca. Takođe, uočeno je da jedino Y2-aiiA laktonaza vrši degradaciju C14-HSL. Time bi se mogla potvrditi naša pretpostavka da je razlika u supstratnoj specifičnosti ovih AHL laktonaza posledica njihove lokalizacije u ćeliji kao i funkcije. Poznato je da *B. cepacia* sintetiše AHL [56], stoga bi intracelularna YtnP laktonaza 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. Na ovaj način *B. cepacia* bi mogla autoregulirati 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 (*anol* i *anoR*) [38]. Zatim, *B. cepacia* ne proizvodi AHL dugog acilnog lanca [57], stoga nema potrebu za laktonazama širokog spektra aktivnosti ukoliko su one uključene samo u regulaciju sopstvene QS mreže, te bi se razlika u supstratnoj specifičnosti ova dva enzima mogla smatrati posledicom njihove biološke uloge. Uočena zavisnost nivoa ekspresije gena i promotorske aktivnosti gena koji kodiraju laktonaze od faza rasta bakterijske kulture može ukazivati na različite metaboličke aktivnosti i regulaciju ovih laktonaza u QS/QQ mreži *B. cepacia* BCC4135 [58].

Poznato je da formiranje biofilma i produkcija drugih faktora virulencije mogu biti sprečeni ili makar oslabljeni kao posledica enzimske degradacije QS signala [21]. Efikasnost QQ laktonaza u degradaciji AHL molekula kroz smanjenje virulentnog potencijala analiziranih model sistema dokumentovana je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama [32,55]. YtnP i Y2-aiiA ostvarile su značajno delovanje u smanjenju virulentnog fenotipa kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, kroz inhibiciju formiranja biofilma i produkcije ekstracelularnih faktora virulencije. Y2-aiiA laktonaza ostvarila je znatniji efekat u sprečavanju formiranja biofilma, što je u korelaciji sa njenom većom supstratnom specifičnošću za AHL odgovorne za inicijalnu fazu formiranja biofilma *P. aeruginosa* [28]. Oba QQ enzima utiču na smanjenje virulentnog fenotipa kroz inhibiciju produkcije ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, pirocijanina i ramnolipida *P. aeruginosa* i samim tim bi mogli sprečiti ili makar ublažiti bakterijsku infekciju. Antivirulentni efekat YtnP i Y2-aiiA laktonaza potvrđen je i na transkripcionom nivou. Pogođena su dva glavna QS sistema vrste *P. aeruginosa* - *las* i *rhl*, koja kontrolišu produkciju faktora virulencije i formiranje biofilma. Utišavanje QS sistema bilo je značajnije kada su YtnP i Y2-aiiA enzimi primenjeni zajedno u odnosu na primenu svakog od enzima pojedinačno. Pored toga, BCC4135 rekombinantne laktonaze vrše utišavanje i *pqs* QS mreže *P. aeruginosa*, što je po prvi put otkriveno među laktonazama, pored opisanih QQ enzima acilaze i dioksidogeneze [59]. Stoga se može zaključiti da obe laktonaze imaju značajan terapeutski potencijal ostvaren kroz smanjenje patogenosti *P. aeruginosa*.

Iako je do danas je identifikovano mnoštvo jedinjenja koja imaju sposobnost interferencije sa QS sistemom *P. aeruginosa*, većina okarakterisanih antivirulentnih agenasa je citotoksična ili pokazuje nepovoljna farmakološka svojstva, što ograničava njihovu primenu u kliničkoj praksi [60]. Među okarakterisanim QQ enzimima, PvdQ acilaza poreklom iz *P. aeruginosa* nije ostvarila citotoksičan efekat na ćelije plućnog epitela, te predstavlja dobrog kandidata za razvoj antivirulentnih lekova [61]. Stoga je od velike važnosti bilo ispitati da li *B. cepacia* BCC4135 rekombinantne laktonaze poseduju najznačajnije svojstvo u medicinskoj primeni, odnosno odsustvo citotoksičnosti na ćelije čoveka. S obzirom da smo u okviru našeg istraživanja utvrdili da YtnP i Y2-aiiA laktonaze ne ostvaruju citotoksični efekat na ćelijsku liniju HaCaT humanih keratinocita, one se kandiduju za potencijalnu primenu u kliničkoj praksi.

Bitno je naglasiti da *B. cepacia* BCC4135 takođe poseduje QS sistem. Sposobnost ove bakterijske vrste da preživi u veoma heterogenim uslovima životne sredine može se u znatnoj meri pripisati međućelijskoj komunikaciji [49]. 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. QS sistem kod *Burkholderia* vrsta kontroliše veći broj funkcija uključujući pokretljivost, formiranje biofilma i produkciju faktora virulencije proteaza, toksina i antifungalnih jedinjenja. *B. cepacia* BCC4135 koristi CepsI/R (AnolI/R) globalni regulatorni QS sistem koji je visoko konzervisan među *Burkholderia* vrstama [62]. Budući da je nivo transkripcije BCC4135 QS gena u skladu sa nivoom ekspresije gena koji kodira intracelularnu laktonazu YtnP i njenom promotorskom aktivnošću, potvrđuje postulaciju da ovaj enzim ima važnu ulogu u autoregulaciji QS sistema ovog soja. Imajući u vidu da je sposobnost čišćenja i recikliranja sopstvenih QS signalnih molekula kod QS-emitujućih organizama već opisana kod brojnih Gram-negativnih bakterijskih vrsta [58], 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.

## ZAKLJUČAK

Rezultati naših istraživanja doprineli su sagledavanju kompleksnih odnosa unutar polimikrobne zajednice patogenih bakterija kroz fenomen utišavanja međučelijske komunikacije i potencijalnu iskoristivost ove strategije u terapeutske svrhe. Ustanovljeno je da mikroorganizmi koji dele istu ekološku nišu usklađuju svoje ponašanje kao odgovor na intraspecijsku komunikaciju svojih kompetitora posredstvom ometanja njihove međučelijske komunikacije. Imajući u vidu da je QQ relativno redak fenomen u prirodi, te činjenicu da je u okviru ovih 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 prikazanih podataka, može se zaključiti da klinički izolati predstavljaju veoma značajan izvor molekula utišivača međučelijske komunikacije bakterija.

Pored toga, značaj dobijenih rezultata naših istraživanja ogleda se u činjenici da je utišavanje QS sistema vrste *P. aeruginosa* postignuto AHL signalnim molekulima dugog lanca poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304, te 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 naših 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 *B. cepacia* i *P. aeruginosa*. Stoga je moguće govoriti o postojanju autoregulacije QS/QQ mreže soja BCC4135 kroz različitu ekspresiju i aktivnost YtnP i/ili Y2-aiiA laktonaza.

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

## ZAHVALNICA

Ovaj rad finansiran je od strane Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (451-03-9/2021-14/200042). Jedan deo ovog rada realizovan je na Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Napulj, Italija pod rukovodstvom prof dr Antonio Molinaro i dr Flaviana Di Lorenzo, kojima se ovom prilikom zahvaljujem. Hvala dr sci med Zorici Vasiljević sa Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" koja je obezbedila kliničke izolate korišćene u ovom radu, kao i dr Milanu Kojiću i drugim saradnicima Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo za izuzetnu pomoć tokom izrade eksperimenata.

## LITERATURA

- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017;7(2).
- Crone S, Vives-Florez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 2019;128(3):220-231.
- Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care* 2015;3(54).
- De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 2020;33(3):e00181-19.
- Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context* 2018;7:212527.
- Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005;21:319-346.
- Thiel V, Kunze B, Verma P, Wagner-Döbler I, Schulz S. New structural variants of homoserine lactones in bacteria. *Chembiochem* 2009;10(11):1861-1868.
- Guo J, Yoshida K, Ikegame M, Okamura H. Quorum sensing molecule *N*-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone: An all-rounder in mammalian cell modification. *Journal of Oral Biosciences* 2020;62(1):16-29.
- Jiang Q, Chen J, Yang C, Yin Y, Yao K. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International* 2019;15.
- Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomás M, Pérez-Eretza B, et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World journal of clinical cases* 2015;3(7):575-598.
- Pessi G, Haas D. 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* 2000;182(24):6940-6949.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell* 2015;6(1):26-41.

13. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2017;27(6):1053–1064
14. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005;171(11):1209–1223.
15. Hunter RC, Klepac-Ceraj V, Lorenzi MM, Grotzinger H, Martin TR, et al. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2012;47(6):738–745.
16. Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2010;59(3):292305
17. De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 2009;11(2):279–288
18. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control* 2019;8:76.
19. Fernandes P, Martens E. Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology* 2017;133:152–163.
20. Heras B, Scanlon MJ, Martin JL. Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *British journal of clinical pharmacology* 2015;79(2):208–215
21. Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews* 2016;40(1):86–116.
22. Rémy B, Mion S, Plener L, Elias M, Chabrière E, Daudé D. Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Frontiers in pharmacology* 2018;9:203.
23. Storz MP, Maurer CK, Zimmer C, Wagner N, Brengel, C, de Jong, JC, et al. Validation of PqsD as an anti-biofilm target in *Pseudomonas aeruginosa* by development of small-molecule inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* 2012;134(39):16143–16146.
24. Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, Mathison JC, Ruiz DI, et al. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chemistry & biology* 2007;14(10):1119–1127.
25. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology* 2001;67(7):2982–2992.
26. Fetzner S. Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology* 2015;201:2–14.
27. Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology* 2003;69(10):5941–5949.
28. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews* 2013;77(1):73–111.
29. Tang K, Su Y, Brackman G, Cui F, Zhang Y, et al. MomL, a novel marine-derived N-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. *Applied and environmental microbiology* 2015;1(2):774–782.
30. Zhang JW, Xuan CG, Lu CH, Guo S, Yu JF, et al. AidB, a novel thermostable N-acylhomoserine lactonase from the bacterium *Bosea* sp. *Applied and environmental microbiology* 2019;85(24):e02065–19.
31. Fan X, Liang M, Wang L, Chen R, Li H, Liu X. 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* 2017;8:1950.
32. Dong W, Zhu J, Guo X, Kong D, Zhang Q, et al. Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from *Kurthia huakuii* LAM0618T and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Scientific Reports* 2018;8:6013.
33. Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International journal of molecular sciences* 2013;14(9):17477–17500.
34. Furiga A, Lajoie B, El-Hage S, Baziard G, Roques C. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New Quorum Sensing Inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015;60(3):1676–1686.
35. Kim C, Heseck D, Lee M, Mobashery S. Potentiation of the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics by farnesol and its derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2018;28(4):642645.
36. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, et al. Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(8):3929–3931.
37. Malešević M, Di Lorenzo F, Filipić B, Stanisavljević N, Novović K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Scientific Reports* 2019;9:16465.
38. Malešević M, Stanisavljević N, Novović K, Polović N, Vasiljević Z, et al. *Burkholderia cepacia* YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of *Pseudomonas aeruginosa* via quorum quenching activity. *Microbial Pathogenesis* 2020;149:104561.
39. Juárez-Jiménez B, Manzanera M, Rodelas B, Martínez-Toledo MV, Gonzalez-López J, et al. Metabolic characterization of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation*, 2010;21(3):475–489.
40. Ranc A, Dubourg G, Fournier PE, Raoult D, Fenollar F. *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. *Emerging infectious diseases* 2018;24(3):594–596.
41. Singh VK, Kavita K, Prabhakaran R, Jha B. Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and antibiofilm activities. *Biofouling* 2013;29(7):855–867.
42. Chang H, Zhou J, Zhu X, Yu S, Chen L, et al. Strain identification and quorum sensing inhibition characterization of marine-derived *Rhizobium* sp. NAO1. *Royal Society open science* 2017;4(3):170025.
43. Rezzoagli C, Archetti M, Mignot I, Baumgartner M, Kümmerli R. Combining antibiotics with antivirulence compounds can have synergistic effects and reverse selection for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv* 2019;861799.
44. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(6):2655–2661.
45. Yang YX, Xu ZH, Zhang YQ, Tian J, Weng LX, Wang LH. A new quorum sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 2012;50(6):987–993.
46. Swem LR, Swem DL, O'Loughlin CT, Gatmaitan R, Zhao B, et al. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Molecular cell* 2009;35(2):143–153.
47. Soukariéh F, Williams P, Stocks MJ, Cámara M. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry* 2018;61(23):10385–10402.
48. Zhu J, Beabe, JW, Moré MI, Fuqua C, Eberhard A, Winans SC. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* 1998;180(20):5398–5405



49. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology* 2001;39:225-258.
50. Tedesco P, Visone M, Parrilli E, Tutino ML, Perrin E, et al. 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* 2015;10(11):e0142883
51. Eberl L, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology* 2004;294(2-3):123-131.
52. Leitão JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010;87(1):31-40.
53. Schwab U, Abdullah LH, Perlmutter OS, Albert D, Davis CW, et al. Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucus. *Infection and immunity* 2014;82(11):4729-4745.
54. Costello A, Reen FJ, O'Gara F, Callaghan M, McClean S. Inhibition of cocolonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. *Microbiology* 2014;160(7):1474-1487.
55. Bergonzi C, Schwab M, Naik T, Daudé D, Chabrière E, Elias M. Structural and Biochemical Characterization of AaL, a Quorum Quenching Lactonase with Unusual Kinetic Properties. *Scientific reports* 2018;8(1):11262.
56. Aguilar C, Friscina A, Devescovi G, Kojic M, Venturi V. Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *Journal of bacteriology* 2003;185(21):6456-6462
57. Sokol PA, Sajjan U, Visser MB, Ginges S, Forstner J, Kooi C. The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* 2003;149(12):3649-3658.
58. Mayer C, Muras A, Romero M, López M, Tomás M, Otero A. Multiple Quorum Quenching Enzymes Are Active in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2018;8:310.
59. Pusteny C, Albers A, Buldt-Karentzopoulos K, Parschat K, Chhabra SR, et al. Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology* 2009;16(12):1259-1267
60. D'Angelo F, Baldelli V, Halliday N, Pantalone P, Polticelli F, et al. Identification of FDA-Approved drugs as antivirulence agents targeting the pqs quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2018;62:e01296-18.
61. Utari PD, Setroikromo R, Melgert BN, Quax J. PvdQ Quorum Quenching Acylase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in a Mouse Model of Pulmonary Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2018;8:119.
62. Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G, Aguilar C. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Research in Microbiology* 2004;155(4):238-244.



**MOLEKULARNA BIOLOGIJA BILJAKA**  
**MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS**



## IMPRESUM

### Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

**Ivan Strahinić**

Štampa

**Curent Print**, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

**Godišnje**

Tiraž

**200 primeraka**

### Autori

Anđelković Marina .....	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana .....	180
Djusalov Mila .....	21
Đorić Ilona .....	133
Gadjanski Ivana .....	21
Gašić Vladimir .....	113
Išić Denčić Tijana .....	96
Janjušević Ljiljana .....	21
Janković Miljuš Jelena .....	133
Janković Radmila .....	96
Jovčić Branko .....	166
Keckarević Dušan .....	54
Keckarević Marković Milica .....	54
Kecmanović Miljana .....	54
Knežić Teodora .....	21
Kojadinović Milica .....	152
Kokanov Nikola .....	123
Komazec Jovana .....	84
Kosijer Petar .....	21
Kotur Nikola .....	6
Kožik Bojana .....	123
Krajnović Milena .....	123
Malešević Milka .....	166
Nikolić Dragana .....	180
Panić Marko .....	33
Perić Stojan .....	60
Pešović Jovan .....	60
Popović D. Željko .....	21
Radenković Lana .....	60
Rakićević Ljiljana .....	146
Rakočević-Stojanović Vidosava .....	60
Ristić Nina .....	96
Samardžić Jelena .....	180
Savić-Pavićević Dužanka .....	60
Šelemetjev Sonja .....	133
Skakić Anita .....	42
Spasovski Vesna .....	107
Stanković Biljana .....	6
Stojiljković Maja .....	42
Tošić Nataša .....	113
Ugrin Milena .....	84
Vreća Miša .....	107
Zukić Branka .....	6

CIP - Каталогизacija y publikaciji  
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

**TRENDOVI u molekularnoj biologiji** = Trends in  
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.  
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji  
COBISS.SR-ID 45105929