

**М. Б. Галкін, С. В. Водзінський, Л. М. Стрезєва,
М. А. Джура, Б. М. Галкін, Т. О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

**ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA З РІЗНИМ РІВНЕМ
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ЦИКЛО-ДИ-ГМФ
ЗА ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ
АНАЛОГІВ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ**

Мета роботи – дослідження формування біоплівки клітинами *Pseudomonas aeruginosa* з різним внутрішньоклітинним рівнем цикло-ди-ГМФ за впливу оригінальних похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга. **Методи.** Клітини тест штамів інкубували у 96-лункових планшетах за присутності 20, 40 та 80 мкМ досліджуваних сполук. Сполуки були поділені на дві групи – зі зменшеною відносно PQS довжиною алкільного ланцюга та зі збільшеною відносно PQS довжиною алкільного ланцюга. Вміст планктонних клітин визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 600 нм. Формування біоплівки оцінювали за допомогою CV-тесту (crystal violet-тесту) спектрофотометрично за довжини хвилі 592 нм. **Результати.** Отримані результати показали що аналоги PQS зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга, у більшості випадків помірно знижують вміст планктонних клітин, тоді як похідні зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга більш суттєво впливають на цей показник. PQS і його синтетичні аналоги підвищували масу біоплівок *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на 34–79% та 135–217%, відповідно. У разі штаму *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1 досліджувані сполуки чинили протилежну дію – знижували масу біоплівок порівняно з контролем в 1,4–2 рази. **Висновки.** Встановлено, що PQS та його похідні з різною довжиною алкільного замісника модулюють процес формування біоплівки *P. aeruginosa* залежно від внутрішньоклітинного вмісту цикло-ди-ГМФ: стимулюють у штамів з природним і зниженим рівнями, але пригнічують його у разі високого вмісту вторинного месенджера..

Ключові слова: PQS, синтетичні аналоги PQS, циклічний 3,5-дигуанозин-монофосфат (цикло-ди-ГМФ), *Pseudomonas aeruginosa*



Однією з ключових систем мікробної клітини, що впливає на всі аспекти її існування є система міжклітинної комунікації – *quorum sensing* (QS). Система QS забезпечує координовану експресію численних індукційних генів за рахунок використання малих сигнальних молекул, синтез яких залежить від щільності клітин у популяції [7]. Під контролем системи QS знаходиться дуже багато ознак, таких як формування біоплівки, синтез вторинних метаболітів і численних факторів патогенності [15, 16]. Все це робить систему QS перспективною мішенню для пошуку інструментів її регуляції, як з точки зору підвищення синтезу біотехнологічно корисних продуктів, так і з точки зору пошуку нових антимікробних препаратів.

Однією з найбільш вивчених є система QS у *Pseudomonas aeruginosa*. Вона побудована за принципом аутоіндукції та складається з трьох пов'язаних між собою ланок – *las*-, *rhl*- та *pqs*-, в кожній з яких використовується своя сигнальна молекула [6, 8]. Перші дві ланки регулюються ацильованими гомосерин лактонами, що є сигнальними молекулами більшості грамнегативних бактерій [7]. Третя ланка регулюється унікальною сигнальною сполукою – 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолоном, що носить назву PQS (**P**seudomonas **Q**uinolone **S**ignal) [14]. Ця молекула грає величезну роль у функціонуванні клітин *P. aeruginosa*, регулюючи роботу всіх ланок системи QS [6], синтез вторинних метаболітів, таких як рамноліпіди та феназинові пігменти [4], та, навіть, використовується як зброя у конкурентній боротьбі з іншими видами мікроорганізмів [12]. У зв'язку з цим, сьогодні *pqs*-ланка розглядається як потенційна мішень сполук-модуляторів системи QS *P. aeruginosa*. Серед цих сполук, важливе місце мають займати синтетичні аналоги 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолону з різними замісниками [11]. Процес утворення біоплівки контролюється також важливим вторинним месенджером бактерій – циклічним-3,5-дигуанозинмонофосфатом (цикло-ди-ГМФ) [9].

З огляду на вищенаведене, метою даної роботи було дослідження формування біоплівки клітинами *P. aeruginosa* з різним внутрішньоклітинним рівнем цикло-ди-ГМФ за впливу оригінальних похідних 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга.

Матеріали та методи

У роботі було досліджено синтетичні похідні 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга. Сполуки були синтезовані в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова за методикою [10]. Структурні формули досліджених сполук наведені у табл.

В роботі використано штам дикого типу *P. aeruginosa* PA01 з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова і штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (PA01 ΔwspF1) рівнями циклічного дигуанозинмонофосфату, люб'язно надані О. Ржепішевською з університету м. Умео, Швеція. Штами культивували на м'ясо-пептоному агарі при 37 °С та зберігали при 4 °С.

Усі експерименти проводили на рідкому середовищі LB (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0.

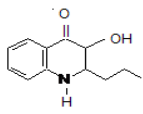
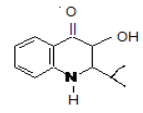
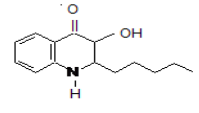
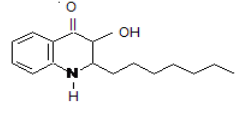
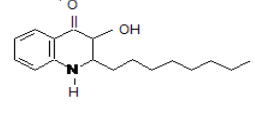
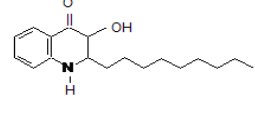
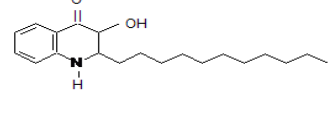


Таблиця

Структурні формули та хімічні назви похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону, використаних у дослідженні

Table

Structure formula and chemical names of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon derivatives, used in this study

Назва сполуки	Структурна формула
2-пропіл-3-гідрокси-4-хінолон, C3Q	
2-ізопропіл-3-гідрокси-4-хінолон, iC3Q	
2-пентил-3-гідрокси-4-хінолон C5Q	
2-гептил-гідрокси-4-хінолон, PQS	
2-октил-3-гідрокси-4-хінолон, C8Q	
2-ноніл-3-гідрокси-4-хінолон, C9Q	
2-ундодеканоїл-3-гідрокси-4-хінолон, C11Q	

Визначення маси біоплівки та кількості планктонних клітин проводили за культивування у 96-лункових плоскодонних планшетах Nuclon. У дослідні лунки додавали по 4 мкл розчинів досліджуваних сполук у диметилсульфоксиді (ДМСО) до кінцевих концентрацій 20, 40 та 80 мкМ; 20 мкл суспензій клітин тест-штамів *P. aeruginosa* (10^3 КУО/мл) та 180 мкл середовища LB. У контрольні лунки замість сполук додавали 4 мкл ДМСО. Планшети інкубували при 37 °С впродовж 24 годин.



Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично за довжині хвилі 600 нм.

Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин біоплівки фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв, висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хв барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 200 мкл лізувального розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густану вимірювали за довжини хвилі 592 нм [3].

Вимірювання здійснювали на приладі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary).

Усі експерименти проводили у 3-х незалежних дослідах з 8 повторами у кожному. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S\bar{X}$). Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].

Результати та їх обговорення

Використані у роботі штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) і з високим (PA01 Δ wspF1) порівняно з батьківським штамом вмістом цикло-ди-ГМФ були сконструйовані у лабораторії Caroline S. Harwood [5]. Рівень цикло-ди-ГМФ у клітинах залежить від активності двох специфічних ензимів – дигуанілатсинтази (WspR) та цикло-дигуанілат фосфодіестерази (протеїн PA2133). Виснаження рівня вторинного месенджера у *P. aeruginosa* pJN2133 досягається за рахунок додаткових копій гена PA2133, введених в клітини у складі плазмиди pJN105 (пустий вектор). Підвищенню рівня цикло-ди-ГМФ у *P. aeruginosa* Δ wspF1 сприяє мутація в гені *wspF*, продукт якого є негативним регулятором дигуанілатсинтази.

Дослідження впливу PQS на вміст планктонних клітин використаних тест-штамів (рис. 1 А-В) показало, що ця сполука дещо знижує їх кількість у штамів з середнім та зменшеним внутрішньоклітинним рівнем цикло-ди-ГМФ. Так, за присутності 80 мкМ PQS кількість клітин у планктоні *P. aeruginosa* PA01 становила 80%, а у планктоні *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 – 69% від контролю.

У той же час, у разі *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1 характер дії сигнального хінолону відрізнявся від двох інших штамів (рис. 1Б). За присутності 20 мкМ PQS спостерігалася невелике – на 17%, зростання кількості планктонних клітин, тоді як за двох інших концентрацій дані не відрізнялися від контролю.

Синтетичні аналоги PQS зі зменшеним числом атомів вуглецю в ацильному заміснику в цілому виявляли тотожну сигнальному хінолону дію. До відмінностей слід віднести більш значний пригнічувальний вплив сполуки C5Q у концентрації 80 мкМ. Кількість планктонних клітин *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 достовірно знижувалася у 1,5, 2,5 та 2,7 рази, відповідно. Сполука iC3Q чинила однакову дію на штами PA01 і PA01 Δ wspF1 за усіх досліджених концентрацій. Крім того,



на відміну від PQS, C3Q і C5Q, цей аналог у концентраціях 20 і 40 мкМ не підвищував кількості клітин *P. aeruginosa* PA01 $\Delta wspF1$ у планктоні (рис. 1Б).

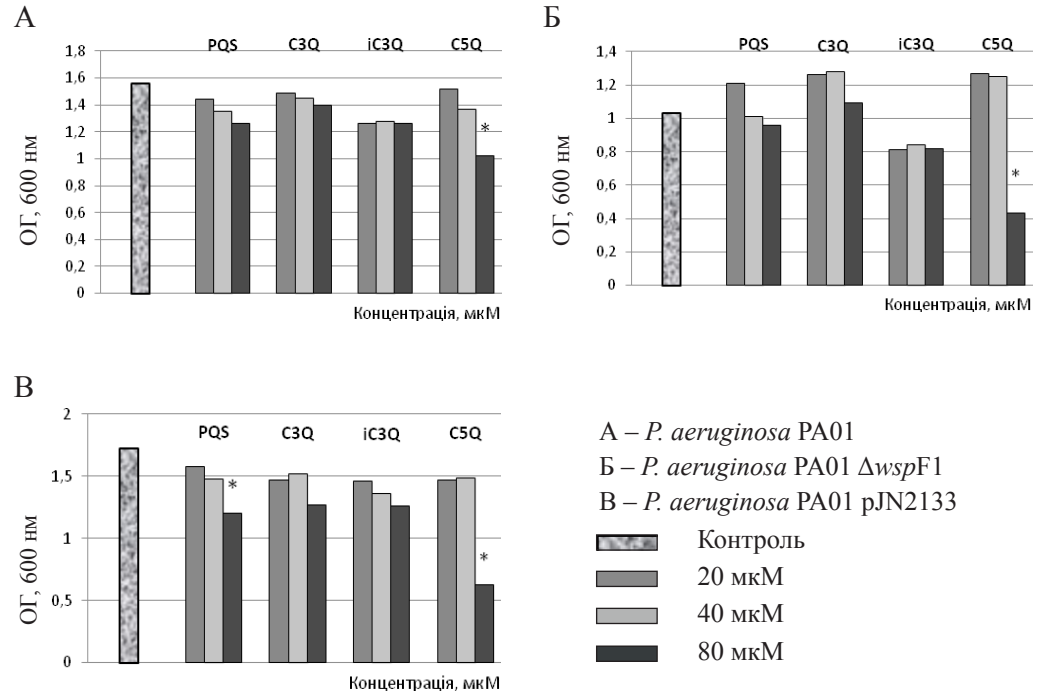


Рис. 1. Вплив PQS та його синтетичних аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга на вміст планктонних клітин тест-штамів *P. aeruginosa*
Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Effect of PQS and its synthetic analogs with short alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains planktonic cells content

Note: * – the differences were significant in comparison with control

Дані щодо активності похідних з більшою ніж у PQS довжиною алкільного ланцюга наведені на рис. 2.

Встановлено, що усі три сполуки цієї групи – C8Q, C9Q, C11Q, дозозалежним чином зменшували вміст планктонних клітин всіх досліджених штамів *P. aeruginosa*. Найбільшу активність виявили сполуки C8Q і C9Q, які переважали дію як самого PQS так і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга. Особливо суттєві відмінності у порівнянні з контролем та ефектами сигнального хінолону спостерігалися при концентрації 80 мкМ. Встановлено, що усі три сполуки цієї групи – C8Q, C9Q, C11Q, дозозалежним чином зменшували вміст планктонних клітин всіх досліджуваних штамів *P. aeruginosa*. Найбільшу активність виявили сполуки C8Q і C9Q, які переважали дію як самого PQS так і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга. Особливо суттєві відмінності у порівнянні з контролем та ефектами сигнального хінолону спостерігалися при концентрації 80 мкМ. Так, C8Q знижував проти контролю кількість клітин у планктоні в 2,3; 2,2



та 2,8 рази у штамів *P. aeruginosa* PA01, PA01 Δ wspF1 та PA01 pJN2133, відповідно. При порівнянні з PQS зареєстровано дворазове зменшення кількості планктонних клітин за дії цієї сполуки. 2-Ноніл-3-гідрокси-4-хінолон (C9Q) чинив на досліджувані штами таку саму дію, що і C8Q, з деякими незначними кількісними відмінностями. *P. aeruginosa* PA01 та PA01 pJN2133 виявилися менш чутливими до дії C11Q (рис. 1 А і В). Хоча вплив цієї сполуки на *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1 був таким самим, що C8Q і C9Q (рис. 1 Б).

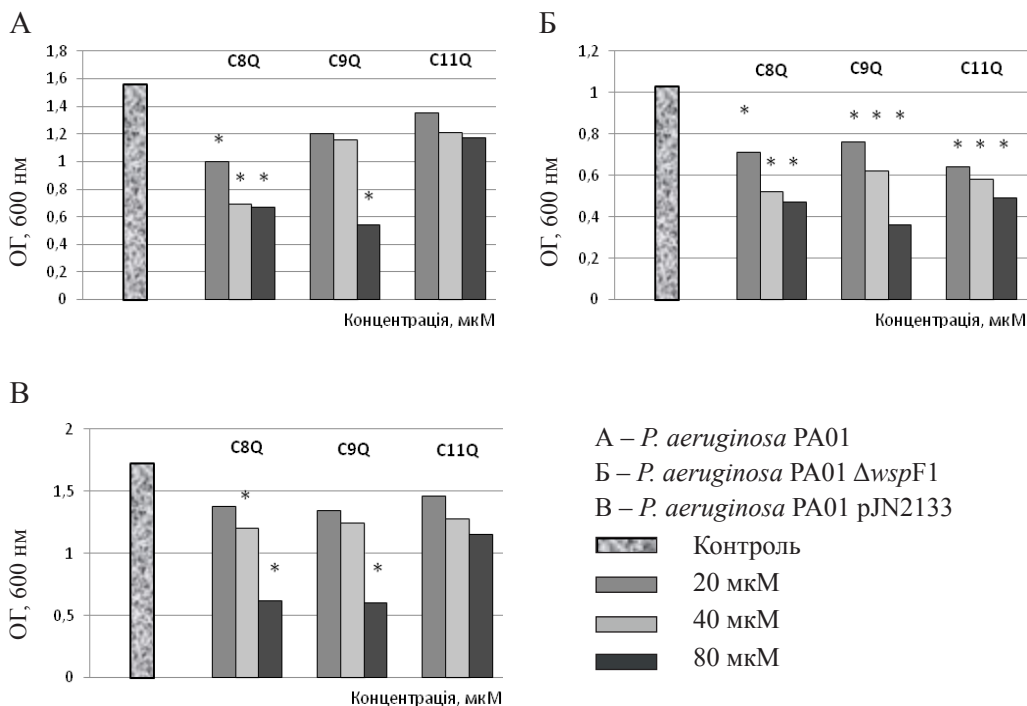


Рис. 2. Вплив синтетичних аналогів PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга на вміст планктонних клітин тест-штамів *P. aeruginosa*
 Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. Effect of synthetic analogs of PQS with long alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains planktonic cells content

Note: * – the differences were significant in comparison with control

За масою утвореної біоплівки досліджувані штами, як було показано нами раніше [1], розміщуються таким чином: *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 < *P. aeruginosa* PA01 < *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1. За результатами даного дослідження відмінності у кількісних значеннях цього показника між штамами становлять 1,9–3,8 рази. При цьому найбільша різниця спостерігається між штамами з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (*P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1) вмістом внутрішньоклітинного цикло-ди-ГМФ.

Результати дослідження впливу сигнального хінолону та його синтетичних аналогів представлені на рис. 3 і 4.

Встановлено, що на відміну від односпрямованого характеру дії дослід-

жуваних сполук на вміст планктонних клітин усіх штамів *P. aeruginosa*, вони протилежним чином впливають на утворення біоплівки різними штамми. PQS і його аналоги стимулюють цей процес у штамів *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 та пригнічують його у *P. aeruginosa* PA01 $\Delta wspF1$. Як видно на рис. 3 А і В, PQS пропорційно концентрації підвищує масу біоплівки *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на 34–79% та 135–217%, відповідно.

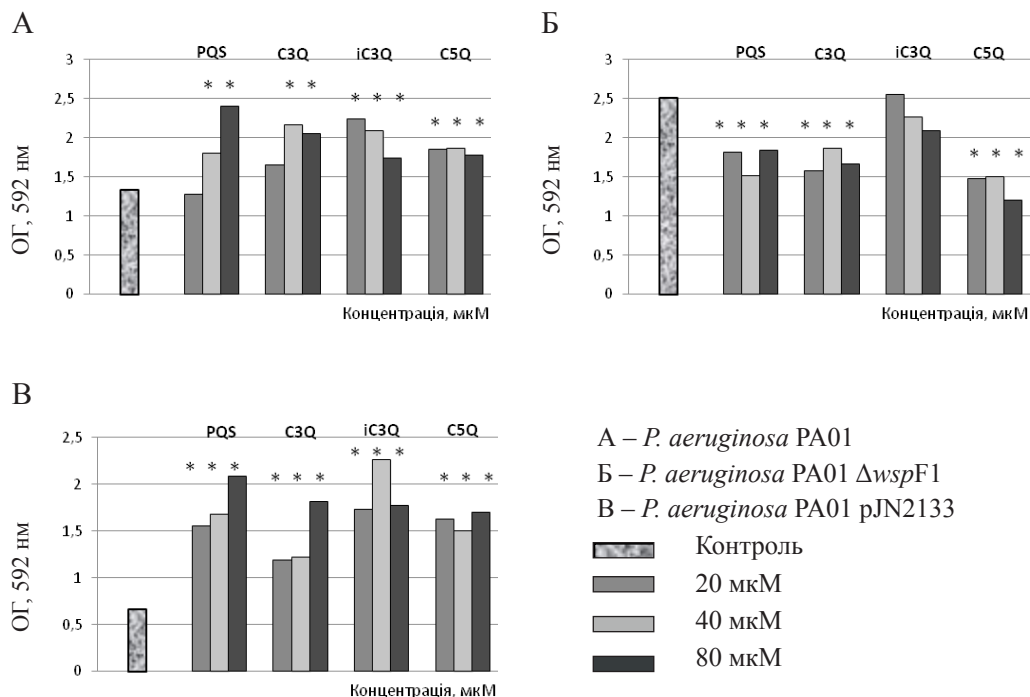


Рис. 3. Вплив PQS та його синтетичних аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга на формування біоплівки тест-штамами *P. aeruginosa*
 Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 3. Effect of PQS and its synthetic analogs with short alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains biofilm formation

Note: * – the differences were significant in comparison with control

Подібні зміни формування біоплівки цими штамми *P. aeruginosa* викликали і похідні C3Q, iC3Q та C5Q. При цьому слід зазначити, що PQS і його аналоги ефективніше стимулювали даний процес на тлі низького вмісту цикло-ди-ГМФ у штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. У разі штаму *P. aeruginosa* PA01 $\Delta wspF1$ досліджувані сполуки чинили протилежну дію. За їх присутності маса біоплівки порівняно з контролем була нижчою в 1,4–2 рази.

Такий самий характер змін маси біоплівки спостерігався і за впливу аналогів сигнального хінолону зі збільшеною довжиною алкільного замісника (рис. 4).



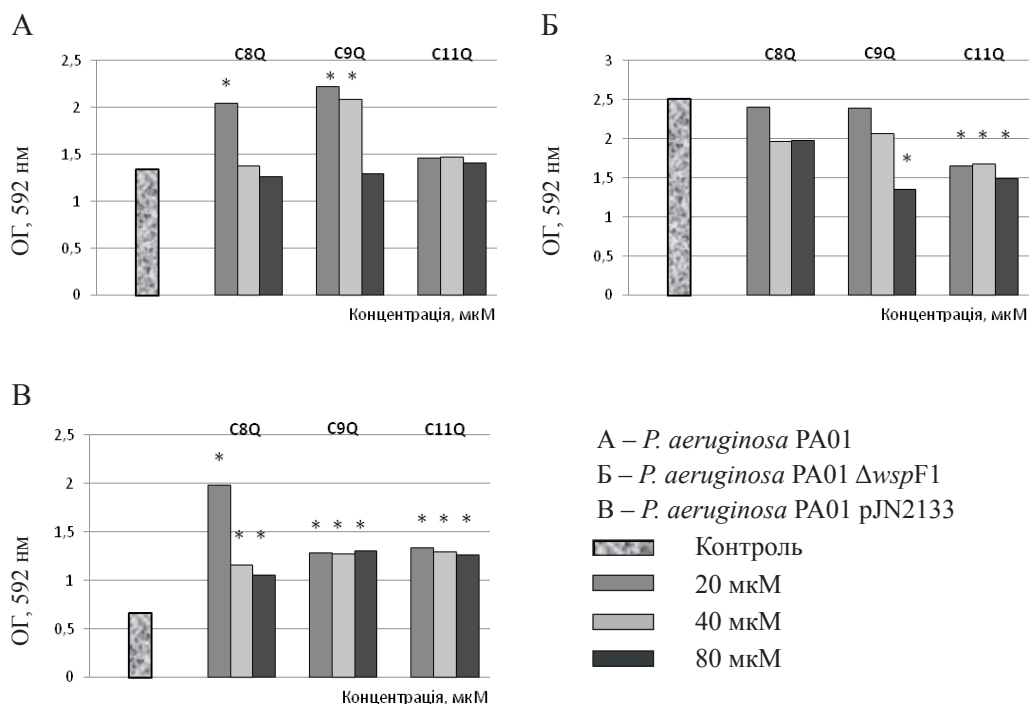


Рис. 4. Вплив синтетичних аналогів PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга на формування біоплівки тест-штамами *P. aeruginosa*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 4. Effect of synthetic analogs of PQS with long alkyl chain action on *P. aeruginosa* test-strains biofilm formation

Note: * – the differences were significant in comparison with control

Однак, сполука С8Q виявляла найбільшу стимулювальну дію у концентрації 20 мкМ (штами PA01 і PA01 pJN2133). Підвищення концентрації або відміняло цей ефект (*P. aeruginosa* PA01), або суттєво його знижувало (*P. aeruginosa* PA01 pJN2133). Синтетичний аналог С9Q у концентраціях 20 та 40 мкМ на 65% підвищував масу біоплівки *P. aeruginosa* PA01, але не змінював її у концентрації 80 мкМ (рис. 4А). У разі *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 С9Q викликав однакове за усіх концентрацій зростання маси біоплівки – у 1,93 рази (рис. 4А). Такий самий якісний і кількісний вплив на біоплівку даного штаму здійснювала сполука С11Q.

Синтетичні аналоги PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга, як і сполуки С3Q, іС3Q та С5Q, протилежним чином впливали на формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1 (рис. 4Б). Маса біоплівок була меншою за контрольне значення в усіх варіантах. Максимальні ефекти були зареєстровані за 80 мкМ С9Q – зменшення на 47%, та за усіх концентрацій С11Q – на 37%.

Ґрунтуючись на отриманих результатах можна констатувати, що здатність PQS та його похідних модулювати процес формування біоплівки у *P. aeruginosa* залежить від внутрішньоклітинного вмісту цикло-ди-ГМФ. З медичної точки зору представляє інтерес пригнічувальна дія аналогів сиг-

нального хінолону на штам *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF1, клітини якого характеризуються високим рівнем циклічного дигуанозинмонофосфата. Оскільки клітини будь-яких бактерій у складі біоплівки (що спостерігається при інфекціях) мають підвищений рівень цього вторинного месенджера [13] можна припустити перспективність створення на основі досліджених аналогів PQS нових антимікробних засобів з антибіоплівковими властивостями. До найбільш привабливих слід віднести сполуки C5Q і C11Q. Здатність PQS і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга стимулювати утворення біоплівки штамом *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на тлі низького вмісту цикло-ди-ГМФ може бути використана для підвищення синтезу корисних речовин у біоплівкових реакторах.

Стимуляція дослідженими сполуками формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01, клітини якого мають «нормальний», проміжний між двома іншими штамми, рівень цикло-ди-ГМФ, свідчить про їх модулювальний вплив на систему *quorum sensing* і, перш за все, на її *pqs*-ланку. Одержані результати також викликають цікаве запитання – чи можуть PQS та його синтетичні аналоги впливати на систему обміну цикло-ди-ГМФ? Порівняння їх впливу на штам *P. aeruginosa* з різними рівнями вторинного месенджера створює враження, що ці молекули можуть повертати вміст цикло-ди-ГМФ до концентрацій, характерних для батьківського штаму дикого типу. З'ясуванню такої можливості будуть присвячені подальші дослідження.

**Н. Б. Галкін, С. В. Водзінський, Л. М. Стрезєва,
М. А. Джура, Б. М. Галкін, Т. О. Филиппова**
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЦИКЛО-ДИ-ГМФ В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА

Реферат

Цель работы. Изучение формирования биопленки клетками *Pseudomonas aeruginosa* с различным внутриклеточным уровнем циклического-3,5 дигуанозинмонофосфата (цикло-ди-ГМФ) в присутствии оригинальных производных 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона с разной длиной алкильной цепи.

Методы. Клетки тест штаммов инкубировали в 96-луночных планшетах в присутствии 20, 40 и 80 мкм исследуемых соединений. Соединения были разделены на две группы – с уменьшенной относительно PQS длиной алкильной цепи и с увеличенной относительно PQS длиной алкильной цепи. Рост планктонной культуры определяли спектрофотометрически при длине волны 600 нм. Формирование биопленки оценивали с помощью CV-теста (crystal violet-теста) спектрофотометрически при длине волны 592 нм.

Результаты. Полученные результаты показали, что аналоги PQS с умень-



шенной длиной алкильной цепи в большинстве случаев умеренно снижали содержание планктонных клеток, тогда как производные с увеличенной длиной алкильной цепи более существенно влияли на этот показатель. PQS и его синтетические аналоги увеличивали массу биопленок *P. aeruginosa* PA01 и *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 на 34–79% и 135–217%, соответственно. В случае штамма *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 изучаемые соединения оказывали противоположное действие – снижали массу биопленок по сравнению с контролем в 1,4–2 раза. **Выводы.** Показано, что PQS и его производные с разной длиной алкильной цепи модулируют процесс формирования биопленки *P. aeruginosa* в зависимости от внутриклеточного содержания цикло-ди-ГМФ: стимулируют у штаммов с естественным и сниженным уровнями, но угнетают его в случае высокого содержания вторичного мессенджера.

Ключевые слова: PQS, синтетические аналоги PQS, циклический 3,5-дигуанозинмонофосфат (цикло-ди-ГМФ), *Pseudomonas aeruginosa*.

**M. B. Galkin, S. V. Vodzinsky, L. M. Strezeva,
M. A. Dzhura, B. M. Galkin T. O. Filippova**
Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

BIOFILM FORMATION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF THE INTRACELLULAR C-DI-GMP IN PRESENCE OF SIGNAL QUINOLON SYNTHETIC ANALOGS

Summary

Aim. Study of the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* cells with different level of intracellular cyclic-3,5-diguanosinmonophosphate (c-di-GMP) in presence of original derivatives of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon with different length of alkyl chain. **Methods.** Test strain cells were incubated in 96-well plates in presence 20, 40 and 80 μM of discovered compounds. The compounds were divided in to two groups – with shorter length of alkyl chain then in PQS, and with longer length of alkyl chain then in PQS. Planktonic culture growth was determined spectrophotometricly on the wave length 600 nm. Biofilm formation was studied by CV-test (crystal violet-test) spectrophotometricly on the wave length 592 nm. **Results.** The obtained results showed that PQS analogs with shorter length of alkyl chain in most cases slightly decrease planktonic cells content. In the other hand, the derivatives with longer length of alkyl chain showed more sufficient effects on planktonic culture content. PQS and its synthetic analogs increased biofilm mass of *P. aeruginosa* PA01 and *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 on 34–79% and 135–217%, respectively. In the case of *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 the discovered compounds showed opposite effect – the decreased biofilm mass in 1.4–2 times compare to the control. **Conclusions.** It has been shown that PQS and its synthetic derivatives with different alkyl chain length modulate biofilm formation process in *P. aeruginosa* depending on intracellular level of c-di-GMP: stimulate in the strains with natural and decreased amount but inhibit in the case of high amount of this secondary messenger.



Key words: PQS, PQS synthetic analogs, cyclic 3.5-diguanosinemonophosphate (cyclic-di-GMP), Pseudomonas. aeruginosa.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галкін М. Б., Семенець А. С., Фіногенова М. О., Галкін Б. М., Філіпова Т. О. Утворення біоплівки та рухливість бактерій *Pseudomonas aeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату // Мікробіологія і біотехнологія – 2017. – № 2. – С. 40–50.
2. Ланач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морин-он.– 2001. – 260 с.
3. Christensen G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. clin. microbiol. 1985. –V. 22, № 6. – P. 996–1006.
4. Dietrich L.E.P., Price-Whelan A., Petersen A., et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the *quorum sensing* network of *Pseudomonas aeruginosa* // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 61. – P. 1308–1320
5. Hickman J. W., Tifrea D. F., Harwood C. S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels // PNAS. – 2005. – V. 102. – P. 14422–14427.
6. McKnight S. L., Iglewski B H., Pesci E C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 2702–2708.
7. Ng W. L., Bassler B. L. Bacterial *quorum-sensing* network architectures // Annu. Rev. Genet. – 2009. – V. 43. – P. 197–222.
8. Pesci E. C., Iglewski B. H. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* *quorum sensing* // Trends Microbiol. – 1997. – Vol. 5. – P. 132–134.
9. Römling U., Gomelsky M., Galperin M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. // Molecular Microbiology. – 2005. – V. 57, № 3. – P. 629–639.
10. Somanathan R., Smith K. M. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids // J. heterocycl. Chem. – 1981. – V. 18. – № 6. – P. 1077–1079.
11. Soukariéh F., Oton E. V., Dubern J-F., et al. In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Molecules – 2018. – V. 23. – P. 257–272.
12. Szamosvári D., Böttcher T. 4-Quinolone N-oxides as bacterial weapons // Synlett. – 2018. – V. 29. – 542–547.
13. Valentini M., Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria // J. Biol. Chem. – 2016. – V. 291, № 24. – P. 12547–12555.
14. Welch M., Hodgkinson J. T., Gross J., et al. Ligand binding kinetics of the quorum sensing regulator PqsR // Biochemistry. – 2013. – V. 52. – P. 4433–4438.
15. Winson M. K., Camara M., Layifi A., et al. Multiple N-acyl-L-homoserine



lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa* (autoinducers/quorum sensing/gene regulation) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – V. 92. – P. 9427–9431.

16. Winzer K., Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria // Int. J. Med. Microbiol. – 2001. – V. 291. – P. 131–143.

References

1. Galkin MB, Semenets AS, Finogenova MO, Galkin BM, Filipova TO. Biofilm formation and motility of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with different c-di-GMP level. Microbiology and Biotechnology. 2017;38(2):40–50. (in Ukrainian) doi: 10.18524/2307-4663.2017.2(38)/105020

2. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v medikobiologicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260p. (in Russian)

3. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. J. clin. microbiol. 1985;22(6):996–1006

4. Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 2006;6:1308–1320. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x

5. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. PNAS.2005;102:14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102

6. McKnight S L, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact.2000;182:2702–2708.

7. Ng WL, Bassler B. Bacterial quorum-sensing network architectures. Annu. Rev. Genet.2009;43:197–222. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134304

8. Pesci EC, Iglewski BH. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. Trends Microbiol.1997;5:132-134. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01008-1

9. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. Mol. Microbiol. 2005;57(3):629-639. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x

10. Somanathan R, Smith KM. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids J. heterocycl. Chem. 1981;18(6):1077-1079. doi: 10.1002/jhet.5570180603

11. Soukariéh F, Oton EV, Dubern J-F, et al. In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Molecules. 2018;23:257-272. doi: 10.3390/molecules23020257

12. Szamosvári D, Böttcher T. 4-Quinolone N-oxides as bacterial weapons. Synlett. 2018;29:542–547.



13. Valentini M, Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J. Biol. Chem.* – 2016;291:12547–12555.

14. Welch M, Hodgkinson JT, Gross J, et al. Ligand binding kinetics of the quorum sensing regulator PqsR. *Biochemistry.* 2013;52:4433–4438. doi: 10.1021/bi400315s

15. Winson MK, Camara M, Layifi A, et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa* (autoinducers/quorum sensing/gene regulation). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:9427-9431.

16. Winzer K, Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 2001;291:131-143. doi: 10.1078/1438-4221-00110.

Стаття надійшла до редакції 08.06.2018 р.

