

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ЛАКТОНОВ НА РОСТ И ХИМИЧЕСКУЮ КОММУНИКАЦИЮ У *CHROMOBACTERIUM SUBTSUGAE*

К.С. Инчагова

к.б.н.,

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» Российской академии наук (г. Оренбург, Россия)

Г.К. Дускаев

д.б.н.,

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» Российской академии наук (г. Оренбург, Россия)

Д.Г. Дерябин

д.м.н., профессор,

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий» Российской академии наук (г. Оренбург, Россия)

E-mail: dgderيابin@yandex.ru

Актуальность. Поиск природных соединений, ингибирующих химическую плотно-зависимую коммуникацию у патогенных бактерий, в настоящее время рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений разработки альтернативных средств для антимикробной химиотерапии.

Цель работы – скрининг биологической активности химически синтезированных аналогов гамма-лактонов растительного происхождения на модели *Chromobacterium subtsugae* с системой химической коммуникации, опосредуемой N-гексаноил-L-гомосерин лактоном (C₆-АГЛ).

Материал и методы. В исследование включены пять гамма-лактонов, содержащих общее пятичленное оксолановое кольцо и отличающихся размером присоединенного к нему линейного алкильного радикала, состоящего из 2, 3, 4, 5 или 8 атомов углерода. Объектом для их воздействия являлась генетически связанная пара штаммов *C. subtsugae* ATCC 31532 и *C. subtsugae* NCTC 13274 с полноценным или дефектным образованием C₆-АГЛ. Критерием ингибирования химической коммуникации у названных бактерий служило 50%-ное подавление биосинтеза пигмента виолацеина, интенсивность которого прямо пропорциональна активности C₆-АГЛ.

Результаты. Впервые документировано ингибирующее воздействие гамма-лактонов на химическую коммуникацию у бактерий, развивающееся в диапазонах от 1,04 мг/мл до 0,02 мг/мл на модели *C. subtsugae* ATCC 31532 и от 0,35 мг/мл до 0,02 мг/мл на модели *C. subtsugae* NCTC 13274. Выраженность и специфичность подобного эффекта оказались прямо пропорциональными длине линейного алкильного радикала в структуре воздействующих молекул, возрастая в ряду от короткоцепочечного гамма-капролактона к длинноцепочечному гамма-додеканолактону.

Выводы. Полученный результат расширяет представления о природе биоактивности лекарственных растений, используемых для терапии инфекционных состояний и имеющих в своём составе соединения из группы гамма-лактонов. Одновременно полученные данные формируют основу для дальнейшего углубленного изучения механизмов биоактивности гамма-лактонов, в том числе – с учетом их структурной близости с C₆-АГЛ, что позволяет предполагать интерференцию между ними в системах химической плотно-зависимой коммуникации у бактерий.

Ключевые слова: гамма-лактоны, ацилированные гомосерин лактоны, *Chromobacterium subtsugae*, химическая плотно-зависимая коммуникация.

Для цитирования: Инчагова К.С., Дускаев Г.К., Дерябин Д.Г. Влияние гамма-лактонов на рост и химическую коммуникацию у *Chromobacterium subtsugae*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(10):38–43. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-10-05>

Гамма-лактоны – это обширная группа органических соединений, являющихся циклическими производными гидроксикарбоновых кислот и возникающих в процессе их внутримолекулярной этерификации (рис. 1). Помимо общего пятичленного оксоланового кольца брутто-формулы C₄H₆O₂ в структуру гамма-лактонов может входить присоединенный к нему в положении 5 различный по длине линейный углеводородный радикал [1].

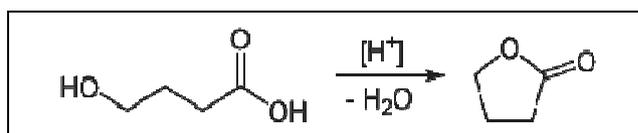


Рис. 1. Механизм образования гамма-лактонов (на примере гамма-бутиролактона)

У прокариот биосинтез гамма-бутиролактона показан для почвенных актинобактерий из рода *Streptomyces*, использующих его в качестве мес-

сенджера в системах межклеточной химической коммуникации. Так у *S. chattanoogensis* это соединение регулирует потребление азота, метаболизм и развитие [2], а у *S. coelicolor* под контролем воспринимающего его рецепторного белка ScbR находится биосинтез антибиотиков [3].

В царстве Plantae γ -лактоны описаны в качестве вкусовых и ароматических компонентов, в том числе обнаруживаемых в составе лекарственных растений, используемых традиционной (народной) медициной для терапии широкого спектра инфекционно-воспалительных состояний. Так, в частности, в базе данных PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) γ -капролактон указывается как компонент шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) и цветкового растения из семейства молочников *Polygala senega*, а γ -нанолактон – как один из компонентов дягиля даурского (*Angelica dahurica*) с выраженными антибактериальными свойствами [4].

Отдельный аспект растущего интереса к исследованию биологической активности γ -лактонов определяется обнаружением структурно близких с ними молекул – ацилированных гомосерин-лактонов (АГЛ), опосредующих плотностно-зависимую химическую коммуникацию у широкого круга фитопатогенных и зоопатогенных протеобактерий [5]. Суть данного феномена заключается в секреции и последующей рецепции АГЛ, результатом которой является скоординированное изменение профиля транскрипции бактериальной популяции, наделяющее прокариотические сообщества некоторыми свойствами многоклеточных организмов [6].

Однако публикации о возможной интерференции между γ -лактонами и гомосерин-

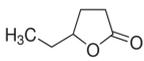
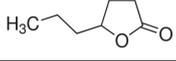
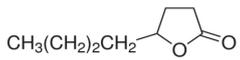
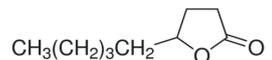
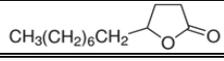
лактонами пока немногочисленны, а представленные в них сведения противоречивы. С одной стороны, воздействие образуемого *S. coelicolor* γ -бутиролактона на АГЛ-контролируемые системы плотностно-зависимой коммуникации у *Vibrio fischeri* и *Pseudomonas aeruginosa* не позволило зафиксировать каких-либо значимых эффектов [7]. С другой – в недавнем исследовании Liu et al. [8] сообщается, что продуцируемые различными видами стрептомицетов γ -бутиролактоны могут напрямую связываться с АГЛ-рецептором у *Chromobacterium violaceum* и вследствие этого подавлять выработку пигмента виолацеина, контролируемую его двухкомпонентной системой плотностно-зависимой химической коммуникации. В свою очередь, работы, посвященные анализу аналогичных эффектов γ -лактонов растительного происхождения, в доступной литературе отсутствуют.

Цель исследования – скрининг биологической активности библиотеки химически синтезированных аналогов γ -лактонов, воспроизводящих структуры этих молекул в царстве Plantae и тестированных на модели *Chromobacterium subtsugae* (ранее – *C. violaceum* [9]) с АГЛ-контролируемой системой плотностно-зависимой коммуникации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Представленная для исследования библиотека химических соединений включала пять γ -лактонов, содержащих общее пятичленное оксолановое кольцо и отличающихся размером присоединенного к нему линейного алкильного радикала, состоящего из 2, 3, 4, 5 или 8 атомов углерода (табл. 1). Указанные соединения с чистотой 97–98% получены от Sigma-Aldrich (США).

Таблица 1. Библиотека γ -лактонов, тестированных в отношении *C. subtsugae*

Название (по IUPAC)	Брутто-формула	Структурная формула	Молярная масса, г/моль
<i>Гамма</i> -капролактон (5-этилоксан-2-он)	C ₆ H ₁₀ O ₂		114,14
<i>Гамма</i> -гептанолактон (5-пропилоксан-2-он)	C ₇ H ₁₂ O ₂		128,17
<i>Гамма</i> -октанолактон (5-бутилоксан-2-он)	C ₈ H ₁₄ O ₂		142,20
<i>Гамма</i> -нанолактон (5-пентилоксан-2-он)	C ₉ H ₁₆ O ₂		156,22
<i>Гамма</i> -додеканолактон (5-октилоксан-2-он)	C ₁₂ H ₂₂ O ₂		198,30

В качестве модельных объектов для воздействия *гамма*-лактонов использовали генетически связанную пару штаммов *C. subtsugae* ATCC 31532 и *C. subtsugae* NCTC 13274 с двухкомпонентной системой плотностно-зависимой коммуникации (рис. 2). Первый из них осуществляет автоиндукцию с применением N-гексаноил-L-гомосерин-лактона (C₆-АГЛ), образующегося под контролем синтазы CviI и воспринимаемого АГЛ-рецептором CviR, следствием чего является изменение профиля транскрипции, в том числе активация *vioABCDE*-оперона, сопровождающаяся образованием сине-фиолетового пигмента виолацеина [10]. В то же время особенностью производного от него штамма *C. subtsugae* NCTC 13274 является инсерция транспозона mini-Tn5 в ген синтазы автоиндуктора, вследствие чего для активации описанного выше механизма требуется присутствие экзогенно вносимого C₆-АГЛ [11], в качестве которого использовали его химически синтезированный аналог с чистотой ≥98% (Cayman Chemicals, США).

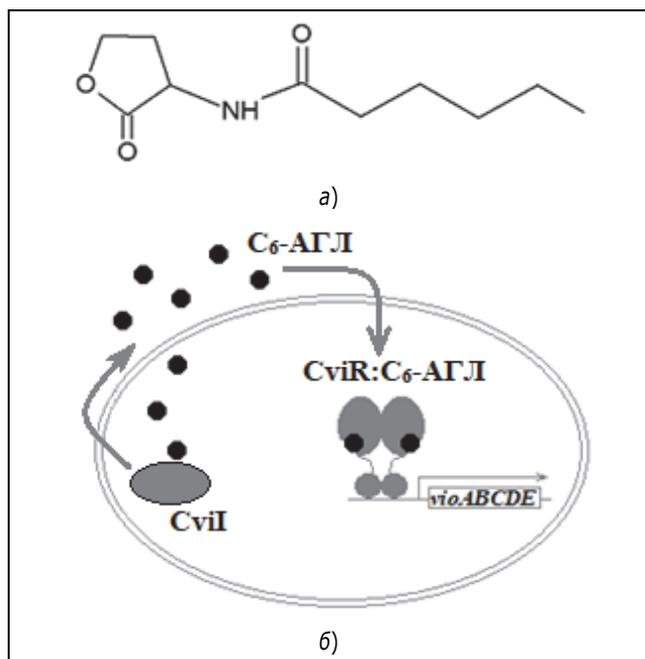


Рис. 2. Принцип организации плотностно-зависимой химической коммуникации у *Chromobacterium subtsugae*: а – молекула автоиндуктора C₆-АГЛ; б – схема двухкомпонентной автоиндукции с участием синтазы CviI и АГЛ-рецептора CviR

Методика биотестирования аналогична ранее использованной авторами для скрининга биоактивности производных N-гексанамида и 2Н-1,3-бензодиоксола [12]. Кратко: в LB-бульоне (Sigma-Aldrich, США) готовили двукратные разведения

тестируемых *гамма*-лактонов (в диапазоне концентраций от 0,005 до 10 мг/мл). В каждое исследование включали дополнительные пробы LB-бульона, не содержащие названных компонентов и используемые в качестве положительного (рост тест-штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. Подготовленными образцами в объеме 200 мкл заполняли ячейки стерильных 96-луночных планшетов (Jet Biofil, Канада-Китай), которые инокулировали 20 мкл суточной культуры *C. subtsugae* ATCC 31532 или *C. subtsugae* NCTC 13274. В последнем случае для индукции системы плотностно-зависимой коммуникации в пробы дополнительно вносили C₆-АГЛ в концентрации 10⁻⁷ М. Планшеты культивировали при +27 °С в течение суток, после чего оценку результатов эксперимента проводили с использованием микропланшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan, Австрия), последовательно регистрируя оптическую плотность (ОП) выросшей бактериальной биомассы при 450±5 нм (ОП₄₅₀), а количественное присутствие пигмента виолацеина при 600±5 нм (ОП₆₀₀). Значения поглощения отрицательного контроля вычитали.

Рост-ингибирующий эффект *гамма*-лактонов оценивали величинами МИК₅₀ – минимальными ингибирующими концентрациями данных соединений, обуславливающими 50%-ное подавление роста тест-штамма относительно положительного контроля. Интенсивность подавления плотностно-зависимой коммуникации выражали величиной ЕС₅₀, соответствующей аналогичной интенсивности ингибирования АГЛ-контролируемого биосинтеза пигмента виолацеина.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием онлайн ресурса <https://medstatistic.ru/>. Различия между рядами наблюдений оценивали U-критерием Манна-Уитни, для оценки зависимостей «структура – функция» выполняли корреляционный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование рост-ингибирующего эффекта *гамма*-лактонов позволило зафиксировать 50%-ное подавление ОП₄₅₀ в диапазоне значений от 3,54 до 0,27 мг/мл на модели *C. subtsugae* ATCC 31532 и от 2,67 до 0,27 мг/мл на модели *C. subtsugae* NCTC 13274 (табл. 2). При этом статистическое сравнение полученных рядов значений давало величину U_{эмп} более чем в три раза превышающую значение U_{кр} (p>0,05), что свидетель-

ствовало о принципиальной идентичности анализируемого эффекта в отношении обоих модельных микроорганизмов. Одновременно могла быть показана тенденция к увеличению рост-ингибирующей активности *гамма*-лактонов с увеличением

размера присутствующего в их молекулах линейного алкильного радикала, на каждом из тестштаммов оказывающейся максимальной (МИК₅₀ = 0,27 мг/мл) при тестировании *гамма*-додеканолактона.

Таблица 2. Воздействие *гамма*-лактонов на рост и плотностно-зависимую коммуникацию у *C. subtsugae*

Исследуемое соединение	На модели <i>C. subtsugae</i> ATCC 31532		На модели <i>C. subtsugae</i> NCTC 13274	
	МИК ₅₀ , мг/мл	ЕС ₅₀ , мг/мл	МИК ₅₀ , мг/мл	ЕС ₅₀ , мг/мл
<i>Гамма</i> -капролактон (5-этилоксан-2-он)	1,77	0,89	2,67	0,35
<i>Гамма</i> -гептаноллактон (5-пропилоксан-2-он)	3,54	1,04	2,08	0,26
<i>Гамма</i> -октаноллактон (5-бутилоксан-2-он)	1,77	0,37	0,71	0,15
<i>Гамма</i> -нонаноллактон (5-пентилоксан-2-он)	0,34	0,04	1,04	0,30
<i>Гамма</i> -додеканоллактон (5-октилоксан-2-он)	0,27	0,02	0,27	0,02

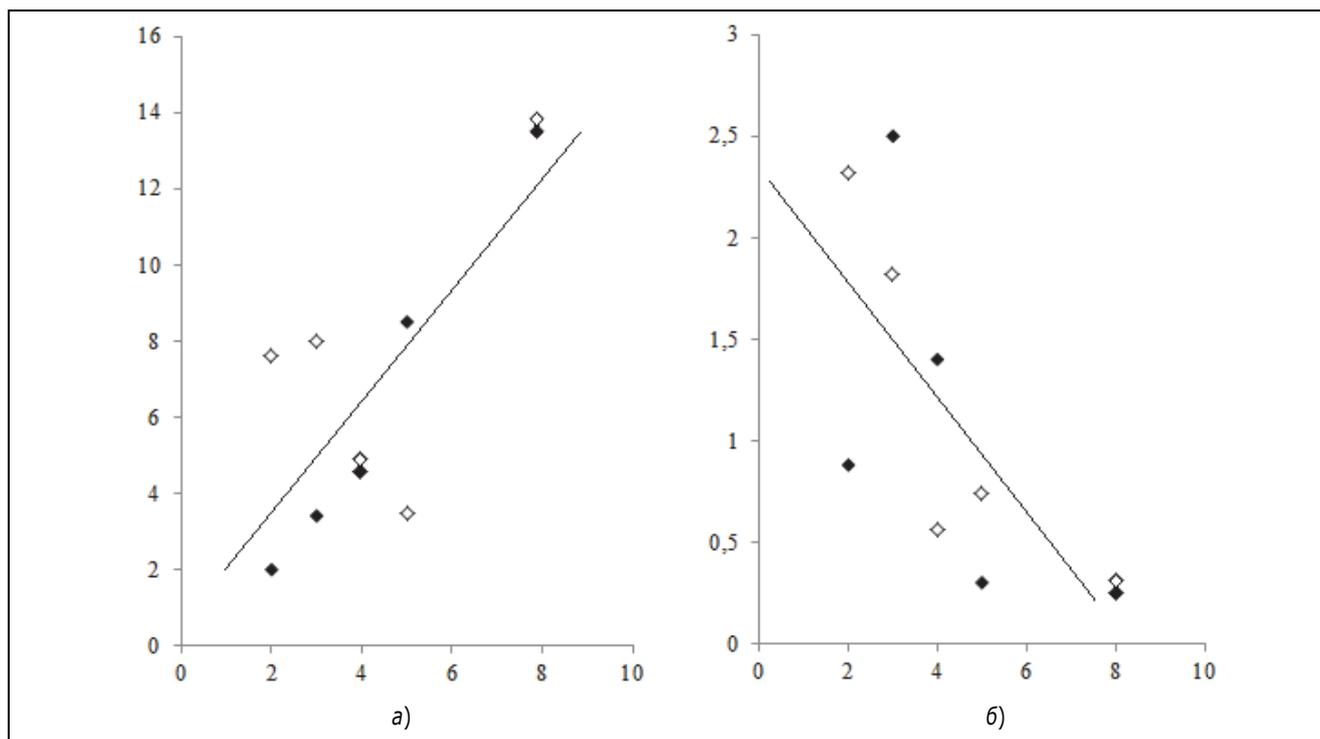


Рис. 3. Зависимости относительных (а) и абсолютных (б) различий между концентрациями МИК₅₀ и ЕС₅₀ у *гамма*-лактонов с различным числом атомов углерода в алкильном радикале. Обозначения: по осям абсцисс – число атомов углерода (n); по осям ординат – в части (а) значения МИК₅₀/ЕС₅₀, в части (б) МИК₅₀ – ЕС₅₀; черные ромбы – данные, полученные на модели *C. subtsugae* ATCC 31532, белые ромбы – на модели *C. subtsugae* NCTC 13274

Исследование воздействия *гамма*-лактонов на систему химической плотностно-зависимой коммуникации у *C. subtsugae*, оцененного по 50%-ному подавлению продукции пигмента виолацеина

(ОП₆₀₀), указывало на его развитие в диапазонах от 1,04 до 0,02 мг/мл на модели *C. subtsugae* ATCC 31532 и от 0,35 до 0,02 мг/мл на модели *C. subtsugae* NCTC 13274 (табл. 2). Достаточно типич-

но концентрации *гамма*-лактонов, требуемых для развития эффекта в отношении «дикого» штамма с полноценной двухкомпонентной системой автоиндукции, оказывались в 2–4 раза выше таковых в отношении штамма с инсерцией транспозона *mini-Tn5* в ген синтазы *CviI*, что может объясняться различной динамикой накопления и утилизации автоиндуктора *C₆-АГЛ* в растущих бактериальных культурах. Однако и в этом случае статистический анализ установил $U_{\text{эмп}} > U_{\text{кр}}$ ($p > 0,05$) как показатель отсутствия значимых различий между рядами наблюдений по воздействию *гамма*-лактонов на плотностно-зависимую коммуникацию у *C. subtsugae* ATCC 31532 в сравнении с *C. subtsugae* NCTC 13274. В свою очередь, вновь обнаружена тенденция к росту активности *гамма*-лактонов в зависимости от длины алкильного радикала, а ее наибольшая выраженность ($EC_{50}=0,02$ мг/мл) зафиксирована при использовании *гамма*-додеканолактона.

Интегральная оценка результатов воздействия *гамма*-лактонов на *C. subtsugae* проведена путем сопоставления относительных ($МИК_{50}/EC_{50}$) и абсолютных ($МИК_{50} - EC_{50}$) различий между концентрациями, обуславливающими 50%-ное подавление роста и химической плотностно-зависимой коммуникации, соотношенных с количеством атомов углерода в составе их алкильных радикалов. Выполненный с этой целью корреляционный анализ свидетельствовал о прямой сильной зависимости значений индекса $МИК_{50}/EC_{50}$ от учитываемой структурной особенности *гамма*-лактонов ($r = 0,777$; $p = 0,010$), что указывало на увеличение специфичности их воздействия на систему плотностно-зависимой коммуникации, возрастающей в ряду от короткоцепочечного *гамма*-капролактона к длинноцепочечному *гамма*-додеканолактону (рис. 3,а). В то же время абсолютные диапазоны между значениями $МИК_{50}$ и EC_{50} в данном ряду устойчиво снижались (рис. 3,б), характеризуясь высоким обратным значением коэффициента корреляции ($r = -0,722$; $p = 0,021$).

Выводы

Результаты проведенного исследования впервые демонстрируют ингибирующее воздействие химических аналогов *гамма*-лактонов растительного происхождения на рост и *АГЛ*-контролируемую систему плотностно-зависимой коммуникации у бактерий, что однозначно указывает на существование функциональной интерференции

между названными группами малых молекул. При этом выраженность подобных эффектов оказывалась прямо пропорциональной длине присутствующего в молекулах *гамма*-лактонов линейного алкильного радикала, состоящего из 2, 3, 4, 5 или 8 атомов углерода.

Полученный результат расширяет представления о природе биоактивности ряда лекарственных растений, используемых традиционной (народной) медициной для терапии различных инфекционных состояний, а именно – позволяет связать её с присутствием в их составе соединений из группы *гамма*-лактонов. Одновременно полученные данные формируют основу для дальнейшего углубленного изучения механизмов биоактивности *гамма*-лактонов, в том числе – в направлении их анализа как структурных ингибиторов бактериальных *АГЛ*-рецептирующих белков, что станет предметом дальнейших исследований.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00036).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Carey F.A., Giuliano R.M. Organic Chemistry (8th ed.). New-York: McGraw-Hill. 2011; pp. 798–99.
- Du Y.L., Shen X.L., Yu P. et al. Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development. Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77(23): 8415–8426.
- Gottelt M., Hesketh A., Bunet R. et al. Characterisation of a natural variant of the γ -butyrolactone signalling receptor. BMC Res. Notes. 2012; 5: 379.
- Lechner D., Stavri M., Oluwatuyi M. et al. The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica* (Bai Zhi). Phytochemistry. 2004; 65(3): 331–335.
- Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. Nature. 2017; 551: 313–320.
- Mukherjee S., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Nat. Rev. Microbiol. 2019; 17: 371–382.
- Biarnes-Carrera M., Lee C.K., Nihira T. et al. Orthogonal regulatory circuits for *Escherichia coli* based on the γ -butyrolactone system of *Streptomyces coelicolor*. ACS Synth. Biol. 2018; 7(4): 1043–1055.
- Liu X., Wang W., Li J. et al. A widespread response of Gram-negative bacterial acyl-homoserine lactone receptors to Gram-positive *Streptomyces* γ -butyrolactone signaling molecules. Sci. China. Life. Sci. 2021; 64(10): 1575–1589.
- Harrison A.M., Soby S.D. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae*. AMB Express. 2020; 10(1): 202.
- Stauff D.L., Bassler B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the *CviR* receptor. J. Bacteriol. 2011; 193(15): 3871–3878.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein

production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology (Reading)*. 1997; 143(12): 3703–3711.

- 12 Дерябин Д.Г., Галаджиева А.А., Дускаев Г.К. Скрининг производных N-гексанамида и 2H-1,3-бензодиазола как модуляторов «кворум сенсинга» у *Chromobacterium*

violaceum. *Микробиология*. 2020; 89(6): 728–736 (Derjabin D.G., Galadzhieva A.A., Duskaev G.K. Screening proizvodnyh N-geksanamida i 2H-1,3-benzodiaksola kak moduljatorov «kvorum sensinga» u *Chromobacterium violaceum*. *Mikrobiologija*. 2020; 89(6): 728–736).

Поступила 11 августа 2022 г.

GAMMA-LACTONES EFFECTS ON GROWTH AND CHEMICAL COMMUNICATION IN *CHROMOBACTERIUM SUBTSUGAE*

© Authors, 2022

K.S. Inchagova

Ph.D. (Biol.),

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)

G.K. Duskaev

Dr.Sc.(Biol.),

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)

D.G. Deryabin

Dr.Sc. (Med.), Professor,

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences (Orenburg, Russia)

E-mail: dgderiyabin@yandex.ru

Relevance. Currently, the search for natural compounds that inhibit density-dependent chemical communication in pathogenic bacteria is the most promising strategy for alternative antimicrobial chemotherapy.

Goal of the study. Screening of chemically synthesized plant-derived gamma-lactone analogs for effects on growth and N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C₆-AHL) mediated chemical communication in a *Chromobacterium subtsugae* model.

Material and methods. Five gamma-lactones containing a common five-membered oxolane ring and a linear alkyl radical of 2, 3, 4, 5, or 8 carbon atoms were included in the study. Genetically related strains of wild-type *C. subtsugae* ATCC 31532 and C₆-AHL-deficient mutant *C. subtsugae* NCTC 13274 were model objects. The criteria for the gamma-lactones bioactivity were 50% suppression of bacterial growth and 50% inhibition of C₆-AHL-dependent pigment violacein biosynthesis, respectively.

Results. The inhibitory effect of gamma-lactones on chemical communication in bacteria was shown in the range from 1.04 mg/ml to 0.02 mg/ml against *C. subtsugae* ATCC 31532 and from 0.35 mg/ml to 0.02 mg/ml against *C. subtsugae* NCTC 13274, while the growth suppression required significantly higher concentrations. The intensity of these effects were directly proportional to the alkyl radical length in the screened molecules, increasing from short chain gamma-caprolactone to long chain gamma-dodecalactone.

Conclusions. The nature of the anti-infective activity of medicinal plants containing gamma-lactones compounds is hypothesized. This point of view provides a perspective for an in-depth analysis of the gamma-lactone bioactivity mechanism, suggesting their interference with structurally similar AHLs in density-dependent chemical communication systems of bacteria.

Key words: gamma-lactones, acylated homoserine lactones, *Chromobacterium subtsugae*, chemical density-dependent communication.

For citation: Inchagova K.S., Duskaev G.K., Deryabin D.G. Gamma-lactones effects on growth and chemical communication in *Chromobacterium subtsugae*. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2022;25(10):38–43. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-10-05>