

## СКРИНИНГ ПРОИЗВОДНЫХ *N*-ГЕКСАНАМИДА И 2*H*-1,3-БЕНЗОДИАКСОЛА КАК МОДУЛЯТОРОВ “КВОРУМ СЕНСИНГА” У *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

© 2020 г. Д. Г. Дерябин<sup>а, \*</sup>, А. А. Галаджиева<sup>б</sup>, Г. К. Дускаев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФГБНУ Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий  
Российской академии наук, Оренбург, 460000 Россия

<sup>б</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук –  
обособленное подразделение ФГБУН “Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения  
Российской академии наук”, Оренбург, 460000 Россия

\*e-mail: dgderyabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.03.2020 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Целью исследования был скрининг оригинальной библиотеки химических соединений на предмет поиска среди них эффективных модуляторов системы “кворум сенсинга” у протеобактерий. В состав тестированной библиотеки вошли 19 молекул, содержащих идентичный с естественным автоиндуктором *N*-гексаноил гомосерин лактоном ( $C_6$ -АГЛ) неполярный радикал *N*-гексанамида или полярную гетероциклическую группу 2*H*-1,3-бензодиоксола. В качестве тест-объекта для оценки их кворум-модулирующей активности использован штамм *Chromobacterium violaceum* CV026 (NCTC 13278) с нарушенным синтезом естественного автоиндуктора  $C_6$ -АГЛ, содержащий функциональный гомодимерный рецептор автоиндуктора CviR, после взаимодействия с двумя молекулами  $C_6$ -АГЛ активирующий транскрипцию ранее молчащих генов, в том числе *vioABCDE*-оперона, что регистрируется как образование сине-фиолетового пигмента виолацеина. По результатам первичного скрининга агонистическая (виолацеин-индуцирующая) активность обнаружена у 4 соединений, а выполнение второго варианта тестирования в присутствии экзогенно внесенного  $C_6$ -АГЛ свидетельствовало о наличии антагонистической (виолацеин-ингибирующей) активности у 9 исследованных соединений. Интересно, что наиболее выраженная антагонистическая активность детектирована у молекул, одновременно показавших себя как агонисты  $C_6$ -АГЛ. При этом их эффективные концентрации, обуславливающие 50% ингибирование кворум-зависимого биосинтеза виолацеина, оказались в 3.2–20.4 раз ниже концентраций, вызывающих его 50% индукцию. Абсолютные концентрации тестированных соединений, необходимые для индукции биосинтеза виолацеина, на несколько порядков превышали требуемую для этого концентрацию естественного автоиндуктора, а выраженность их ингибирующего эффекта была обратно пропорциональна концентрации экзогенно вносимого  $C_6$ -АГЛ. По результатам проведенного скрининга в качестве наиболее эффективного модулятора системы “кворум сенсинга” идентифицирован *N*-1,3-бензодиоксол-5-ил-оксогексанамида, особенности биологической активности которого свидетельствуют о целесообразности его дальнейших исследований в системах *in silico*, *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** кворум сенсинг, автоиндукторы, *Chromobacterium violaceum*, CviR, агонисты, антагонисты

**DOI:** 10.31857/S0026365620050067

“Кворум сенсинг” (англ.: quorum sensing, QS) – механизм химической межклеточной коммуникации у бактерий, обеспечивающий их скоординированное функционирование в микробных популяциях, достигших высокой плотности (Bassler, Losick, 2006). В наиболее общем виде этот феномен включает образование и высвобождение внеклеточных малых сигнальных молекул – автоиндукторов, которые после достижения пороговых концентраций в среде культивирования обуслав-

ливают глобальные изменения паттернов генной экспрессии в рецептирующих их бактериальных клетках (von Bodman et al., 2008). При этом на фоне выраженных молекулярных различий “кворум сенсинга” у грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также значительного разнообразия химической природы автоиндукторов и механизмов их рецепции (Papenfort, Bassler, 2016), наиболее изученной является плотностно-зависимая коммуникация, опосредованная ацилиро-

ванными лактонами гомосерина – АГЛ (англ.: AHL-mediated QS).

Универсальный принцип организации таких систем, описанных уже у нескольких сотен видов протеобактерий, основан на наличии синтаз, катализирующих превращение предшественника *S*-аденозилметионина в молекулы АГЛ, содержащие полярное *N*-ацилированное гомосерин-лактоновое кольцо и неполярную ацильную цепь, у разных таксонов варьирующую по количеству атомов углерода, наличию замещений и степени сатурированности (Case et al., 2008). Амфифильный характер молекул АГЛ определяет возможность их свободного транспорта из клетки в окружающую среду и из среды в клетку по градиенту концентрации, где они воспринимаются специальными рецепторами, типично представляющими собой белковые гомодимеры с *N*-концевыми АГЛ-связывающими доменами (Zhang et al., 2002). Результатом рецепции двух молекул АГЛ является изменение конформации белковых гомодимеров, обеспечивающее возможность взаимодействия их *S*-концевых ДНК-связывающих доменов со специфическими нуклеотидными последовательностями на бактериальной хромосоме с последующей за этим инициацией транскрипции расположенных рядом генов-мишеней или целых оперонов.

Активируемые данным способом варианты биологической активности неэффективны при реализации одиночными клетками, но ярко проявляются при их скоординированной деятельности в составе бактериальных популяций, что объясняет целесообразность феномена плотно-зависимой химической коммуникации (Bassler, Losick, 2006). При этом принципиально важным является нахождение под QS контролем таких проявлений коллективного поведения бактерий, как синтез факторов вирулентности и образование биопленок, что определяет оценку АГЛ-опосредованного “кворум сенсинга” как новой перспективной мишени для адресного воздействия на фито- и зоопатогенные протеобактерии (Remy et al., 2018).

Предложенные к настоящему времени стратегии ингибирования “кворум сенсинга” достаточно разнообразны и включают подавление активности АГЛ-синтаз, внеклеточное связывание или ферментативную деградацию молекул автоиндукторов, а также интерференцию других малых молекул с автоиндукторами за взаимодействие с цитоплазматическими белками-рецепторами (Chen et al., 2018). Последний подход оценивается многими экспертами как наиболее перспективный, а его практическая реализация предполагает проведение работ по дизайну, синтезу и биологическому скринингу в значительных по численности библиотеках химических соединений, характери-

зующихся различной степенью структурного подобия АГЛ (Geske et al., 2008).

Целью настоящего исследования явился скрининг библиотеки производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-бензодиоксиола, структурные особенности которых позволяли предполагать возможность конкуренции с автоиндуктором  $C_6$ -АГЛ за взаимодействие с рецепторным белком CviR в тестах индукции или ингибирования кворум-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у штамма *Chromobacterium violaceum* CV026 (NCTC 13278).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Бактериальный штамм.** В качестве инструмента для скрининга кворум-модулирующей активности использован лабораторный штамм *C. violaceum* CV026 (NCTC 13278) с цитоплазматическим белком CviR, который в естественных условиях рецептирует автоиндуктор *N*-гексаноил-*L*-гомосерин лактон ( $C_6$ -АГЛ). После связывания двух молекул  $C_6$ -АГЛ гомодимер CviR переходит из “закрытой” в “открытую” конформацию (Chen et al., 2011), которая распознает на бактериальной ДНК палиндромные последовательности STGNCCNNNNGGCAG и активирует в этих сайтах сборку РНК-полимераз с последующей инициацией транскрипции расположенных рядом ранее молчащих генов и оперонов (Stauff, Bassler, 2011). В частности, под подобным контролем находится *vioABEDC*-оперон, а кодируемые им ферменты формируют каскад биосинтеза сине-фиолетового пигмента виолацеина с максимумом поглощения при 585 нм (Sanchez et al., 2006), интенсивность накопления которого в бактериальной культуре прямо пропорциональна степени активации “кворум сенсинга”.

Важным дополнительным свойством штамма *C. violaceum* CV026 является инсерция транспозона mini-Tn5 в ген синтазы автоиндуктора, вследствие чего для активации описанного выше механизма кворум-зависимой транскрипции требуется присутствие экзогенно вносимого  $C_6$ -АГЛ (McClellan et al., 1997) или других АГЛ-имитирующих молекул (Blosser, Gray, 2000).

**Химические соединения.** Представленная для исследования оригинальная библиотека включала ряды химических соединений, воспроизводящих элементы структуры ацилированных лактонов гомосерина, что позволяло предполагать возможность их прямой конкуренции с природным автоиндуктором “кворум сенсинга” за связывание с соответствующим рецепторным белком.

Первый принцип дизайна данной библиотеки заключался в формировании ряда из 10 малых молекул (рис. 1, по вертикали), общим элементом структуры которых являлось наличие неполярного радикала *N*-гексанамида (брутто-формула  $C_6NO$ ), иден-

тичного таковому в молекуле  $C_6$ -АГЛ и ковалентно присоединенного к полярным циклическим группировкам различного строения и состава. В свою очередь, вторая группа из 10 малых молекул объединялась наличием общей гетероциклической группы 2*H*-1,3-бензодиоксола (брутто-формула  $C_7H_6O_2$ ), ковалентно присоединенной к различающимся по составу и строению линейным или циклическим неполярным радикалам (рис. 1, по горизонтали). На пересечении вертикально и горизонтально расположенных рядов находится молекула *N*-1,3-бензодиоксол-5-ил-оксогексанамида, объединяющая обе описанные выше структурные особенности. Общая численность библиотеки составила 19 химических соединений, полное наименование которых в соответствии с номенклатурой Международного союза теоретической и прикладной химии (англ.: International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC) приведено в табл. 1.

Описанная библиотека сформирована путем приобретения коммерчески доступных химических соединений с чистотой не менее 99% по каталогу “Sigma-Aldrich” (США) и заказного синтеза отсутствующих соединений с чистотой не менее 95% в компании “Enamine Ltd” (Украина).

Для контрольной индукции “кворум сенсинга” и проведения исследований по его ингибированию использован химически синтезированный аналог  $C_6$ -АГЛ с чистотой  $\geq 98\%$  (“Cauman Chemicals”, США).

**Метод исследования кворум-модулирующей активности на модели *C. violaceum* CV026.** Скрининг кворум-модулирующей активности тестируемых химических соединений проводили в двух вариантах: 1) без внесения в пробы  $C_6$ -АГЛ – для выявления соединений с виолацеин-индуцирующей (агонистической по отношению к данному автоиндуктору) активностью; 2) при внесении в пробы  $C_6$ -АГЛ – для выявления виолацеин-ингибирующей (антагонистической по отношению к автоиндуктору) активности.

Перед проведением тестирования эквимольные навески исследуемых соединений растворяли в 95% этаноле. Для первой серии экспериментов из полученных спиртовых растворов готовили серии двукратных разведений в LB-бульоне (“Sigma”, США), формируя ряды концентраций исследуемых соединений в диапазоне от 2 до 1000 мкМ. Для второй серии экспериментов аналогичные ряды разведений исследуемых соединений готовили в LB-бульоне с предварительно внесенным в него автоиндуктором  $C_6$ -АГЛ в конечных кон-

центрациях 1, 10 или 100 нМ. В каждый вариант исследования включали дополнительные пробы LB-бульона, содержащие только  $C_6$ -АГЛ (положительный контроль, обеспечивающий 100% индукцию виолацеина) или пробы чистого LB-бульона (отрицательный контроль, рост непигментированной культуры). Подготовленные ряды разведений и контрольные пробы переносили в лунки стерильных 96-луночных планшетов в объеме 200 мкл, инокулировали 10 мкл культуры *C. violaceum* CV026 и культивировали в статическом режиме при 27°C в течение 1 сут. Результаты эксперимента оценивали с использованием микрострипового фотометра STAT FAX 303 VIS+ (“Awareness Technology”, США), последовательно регистрируя оптическую плотность бактериальных культур (при  $450 \pm 5$  нм) и количественное содержание пигмента виолацеина в этанольных экстрактах их биомассы (при  $600 \pm 5$  нм). Значения поглощения отрицательного контроля вычитали.

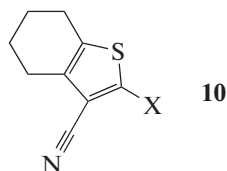
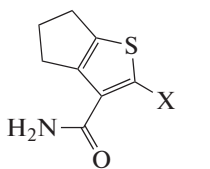
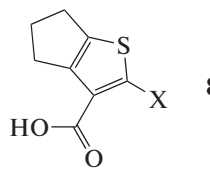
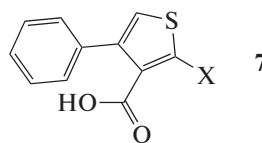
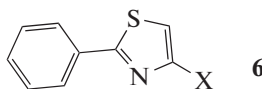
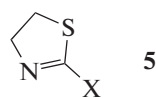
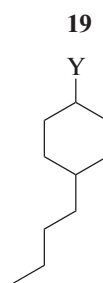
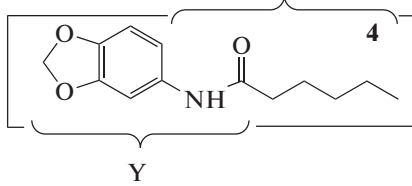
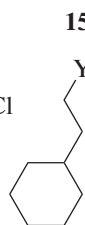
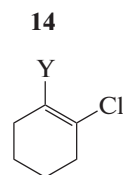
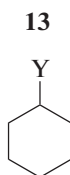
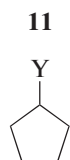
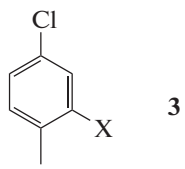
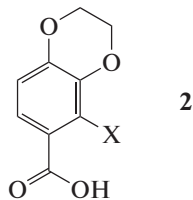
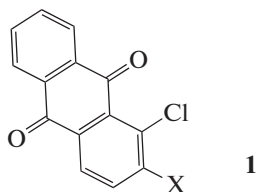
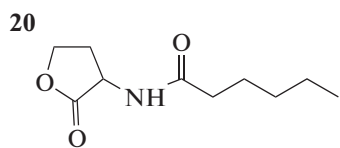
Проявление QS-модулирующих эффектов исследуемых соединений выражали величинами EC50, которые соответствовали их концентрациям, вызывающим 50% индукцию (EC50<sub>инд</sub>; 1 вариант экспериментов) или 50% ингибирование (EC50<sub>инг</sub>; 2 вариант экспериментов) биосинтеза виолацеина относительно положительного контроля.

**Статистическая обработка результатов исследования.** Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики в программе Excel для Windows 10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Выявление кворум-индуцирующей (агонистической по отношению к  $C_6$ -АГЛ) активности в тесте индукции биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* CV026.** Тестерный штамм *C. violaceum* CV026 культивировали в жидкой питательной среде, не содержащей  $C_6$ -АГЛ, но с внесенными в нее производными *N*-гексанамида или 2*H*-1,3-бензодиоксола в диапазоне концентраций от 2 до 1000 мкМ. Регистрация значений оптической плотности (ОП<sub>450</sub>) выросших бактериальных культур выявила отсутствие стимулирующего или активизирующего действия тестируемых соединений на рост использованного лабораторного штамма. Последующая экстракция пигмента из выросшей биомассы 95% этанолом и определение оптиче-

**Рис. 1.** Структурные формулы химических соединений, исследованных в тесте индукции/ингибирования кворум-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* CV026. По вертикали: (соединения 1–10) производные *N*-гексанамида (X); по горизонтали (соединения 11–19) производные 2*H*-1,3-бензодиоксола (Y). Нумерация соединений аналогична приведенной в таблице ниже. Соединение 20 – естественный автоиндуктор кворум сенсинга у *C. violaceum* CV026: *N*-гексаноил-L-гомосерин лактон ( $C_6$ -АГЛ).



ской плотности этих экстрактов (ОП<sub>600</sub>) позволили обнаружить продукцию пигмента виолацеина в присутствии 4 из 19 исследуемых химических соединений (табл. 1).

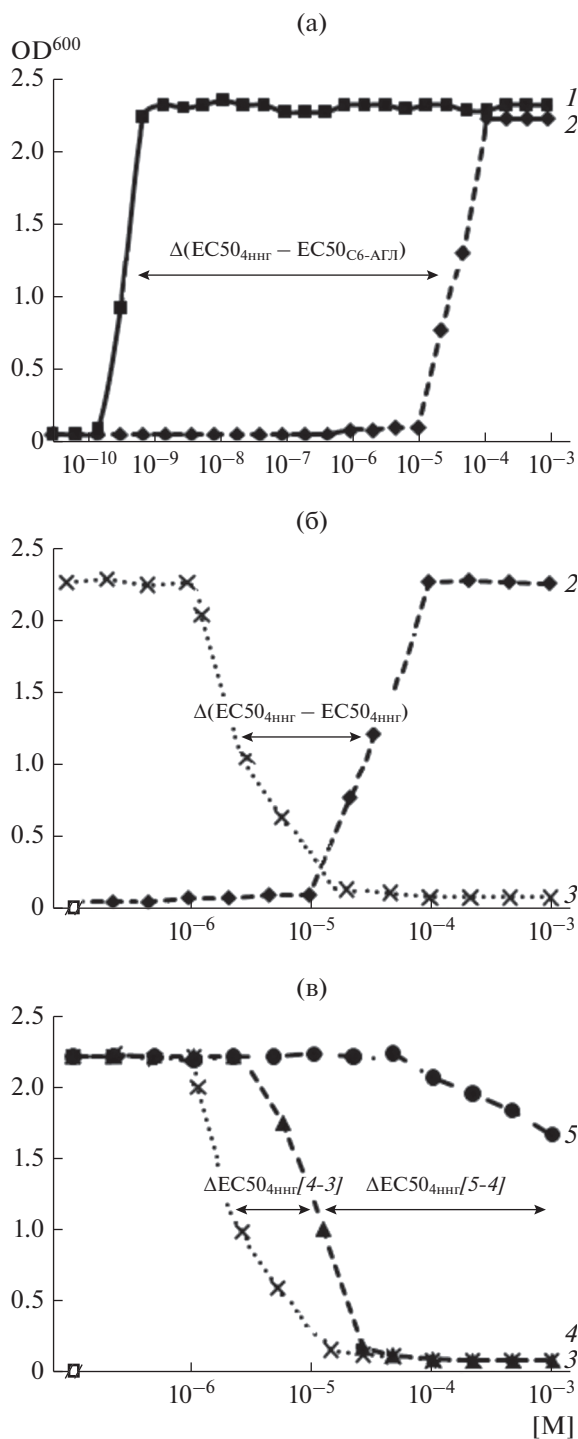
Подобная агонистическая активность установлена у трех производных *N*-гексанамида: соединений 3, 4 и 5 (рис. 1). Наименьшая способность к кворум-зависимой индукции биосинтеза виолацеина, характеризуемая величиной EC50<sub>инд</sub> = 250 мкМ, показана у соединения 3 (*N*-(5-хлор-2-метил-фенил)-гексанамида). Усложнение строения присутствующего в его молекуле полярного шестичленного кольца за счет дополнения антраценовой (соединение 1) или диоксиновой (соединение 2) группировок сопровождалось исчезновением агонистической способности. Соединение 5 (*N*-(4,5-дигидро-1,3-тиазол-2-ил)-гексанамида) было более активным и индуцировало биосинтез виолацеина на уровне 50% от положительного контроля уже в

концентрации 62.5 мкМ. Модификация присутствующего в его молекуле пятичленного тиазолового или сходного по строению тиофенового кольца (у соединений 7–10) полностью отменяла искомый агонистический эффект. Наиболее выраженной агонистической активностью (EC50<sub>инд</sub> = 46.9 мкМ) была зафиксирована у соединения 4 (*N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-гексанамида), однако его концентрация, необходимая для эффективной активации кворум-зависимого биосинтеза виолацеина у *S. violaceum* CV026, была на четыре порядка выше таковой у естественного аутоиндуктора C<sub>6</sub>-АГЛ, характеризуемого величиной EC50<sub>инд</sub> = 0.0005 мкМ (рис. 2а).

Проведение аналогичного скрининга в группе производных 2*H*-1,3-бензодиоксола позволило подтвердить агонистическую активность соединения 4. При этом замещение в его структуре остатка *N*-гексанамида на различные по строению

**Таблица 1.** Количественная характеристика кворум-модулирующей активности производных *N*-гексанамида (1–10) и 2*H*-1,3-бензодиоксола (4, 11–19), оцененной в тесте индукции/ингибирования кворум-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *S. violaceum* CV026

№ соединения	Наименование соединения по IUPAC	Характеристики кворум-модулирующей активности, мкМ	
		EC50 <sub>индукции</sub>	EC50 <sub>ингибирования</sub>
1	<i>N</i> -(1-хлор-9,10-диоксо-9,10-дигидро-2-антраценил) гексанамида	—	—
2	2-(гексаноиламино)-1,4-бензодиоксан-6-карбоновая кислота	—	—
3	<i>N</i> -(5-хлор-2-метилфенил) гексанамида	250.0	45.6
4	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-гексанамида	46.9	2.3
5	<i>N</i> -(4,5-дигидро-1,3-тиазол-2-ил)-гексанамида	62.5	19.5
6	<i>N</i> -(2-фенил-1,3-тиазол-4-ил) гексанамида	—	—
7	2-(гексаноиламино)-4-фенил-3-тиофенкарбоновая кислота	—	—
8	2-гексаноиламино-5,6-дигидро-4 <i>H</i> -циклопента[ <i>b</i> ]тиофен-3-карбоновая кислота	—	73.4
9	2-гексаноиламино-5,6-дигидро-4 <i>H</i> -циклопента[ <i>b</i> ]тиофен-3-карбоксамид	—	81.3
10	<i>N</i> -(3-циано-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-2ил)-гексанамида	—	—
11	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-циклопентанкарбоксамид	—	112.5
12	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-циклопентилацетамид	250.0	50.9
13	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-циклогексанкарбоксамид	—	87.5
14	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-хлор-1-циклогексен-1-карбоновой кислоты	—	—
15	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-3-циклогексилпропанамид	—	100.0
16	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-пропилглицинамида	—	—
17	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-4-(2-метоксиэтокси)-бутанамид	—	—
18	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-3-(3-бутоксипропил) мочевины	—	—
19	<i>N</i> -(1,3-бензодиоксол-5-ил)-4-бутилциклогексанкарбоксамид	—	—
20	<i>N</i> -гексаноил- <i>L</i> -гомосеринлактон (аутоиндуктор “кворум сенсинга” у <i>S. violaceum</i> CV026; положительный контроль)	0.0005	—



**Рис. 2.** Количественные характеристики кворум-модулирующей активности *N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-гексанамида (соединения 4): а – сравнение значений  $EC_{50_{инд}}$  химического аналога аутоиндуктора  $C_6$ -АГЛ (1) и соединения 4 (2) в тесте индукции биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* CV026; б – сравнение значений  $EC_{50_{инд}}$  (2) и  $EC_{50_{инг}}$  (3) соединения 4 в тестах индукции и ингибирования биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* CV026; в – изменение значений  $EC_{50_{инг}}$  соединения 4 в тестах ингибирования биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* CV026 в присутствии  $C_6$ -АГЛ в концентрациях 0.001 (3), 0.01 (4) и 0.1 мкМ (5).

и составу циклические (соединения 11, 13–15, 19) или линейные (соединения 16–18) неполярные радикалы в большинстве случаев приводило к утрате искомой активности. На этом фоне единственным исключением являлось соединение 12 (*N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-циклопентилацетамид), в котором пять атомов углерода были замкнуты в циклопентановое кольцо (рис. 1). Такая модификация, меняющая структуру неполярного радикала, снижала агонистическую активность до  $EC_{50_{инд}} = 250$  мкМ, делая ее сопоставимой с таковой у наименее активного соединения 3 из группы производных *N*-гексанамида (табл. 1).

**Выявление кворум-ингибирующей (антагонистической по отношению к  $C_6$ -АГЛ) активности в тесте ингибирования биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum* CV026.** Условием для скрининга кворум-ингибирующей активности исследуемой библиотеки химических соединений была фоновая индукция биосинтеза пигмента виолацеина, обеспечиваемая внесением в культуру *C. violaceum* CV026 полного химического аналога его естественного аутоиндуктора –  $C_6$ -АГЛ в концентрации 0.001 мкМ. На этом фоне проявлением биологической активности производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-бензодиоксола являлось подавление биосинтеза виолацеина, проявляющееся в росте депигментированных или частично депигментированных культур. Анализ величин оптической плотности полученных из них этанольных экстрактов ( $OP_{600}$ ) позволил зафиксировать и количественно охарактеризовать кворум-ингибирующую активность ( $EC_{50_{инг}}$ ) у девяти из девятнадцати исследуемых химических соединений (табл. 1).

В группе производных *N*-гексанамида антагонистическая активность была выявлена у соединений 3, 4 и 5, в первом варианте проведения эксперимента продемонстрировавших свою агонистическую активность, а также двух структурно сходных молекул на основе тиофена (рис. 1): соединения 8 (2-гексаноиламино-5,6-дигидро-4*H*-циклопента[*b*]тиофен-3-карбоновая кислота) и соединения 9 (2-гексаноиламино-5,6-дигидро-4*H*-циклопента[*b*]тиофен-3-карбоксамид). Проведение аналогичного скрининга в группе производных 2*H*-1,3-бензодиоксола показало наличие искомой активности у соединения 12, ранее также охарактеризованного как индуктор “кворум сенсинга”, и дополнительно – у соединений 11 (*N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-циклопентанкарбоксамид), 13 (*N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-циклогексанкарбоксамид) и 15 (*N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-3-циклогексилпропанамида) с дистальными пяти- или шестичленными углеводородными циклами в неполярном радикале (рис. 1).

Анализ количественных характеристик регистрируемого эффекта позволил сформулировать два принципиальных положения. Во-первых,

наиболее выраженная кворум-ингибирующая активность со значениями  $EC_{50_{инг}}$  в диапазоне от 2.3 до 50.9 мкМ констатирована у соединений 3, 4, 5 и 12, которые в первом варианте скрининга проявили себя как агонисты автоиндуктора, в то время как вновь выявленные соединения 8, 9, 11, 13 и 15 проявляли свою антагонистическую активность в значительно более высоких концентрациях – в диапазоне от 73.4 до 112.5 мкМ. Во вторых, сравнение производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-бензодиоксола свидетельствовало о несколько более выраженной кворум-ингибирующей активности первой группы соединений. Наиболее же выраженная кворум-модулирующая активность оказывалась характерной для соединения 4, сочетающего в себе обе названные структурные особенности.

Сравнение эффективных концентраций соединений 3, 4, 5 и 12, обуславливающих развитие кворум-индуцирующего и кворум-ингибирующего эффектов, обнаружило частичное перекрытие данных диапазонов. При этом проявление антагонистического эффекта требовало в 3.2–20.4 раз меньшей концентрации тестируемых соединений, чем для проявления их агонистического действия. В частности, у наиболее активного соединения 4 (*N*-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-гексанамида) величина  $EC_{50_{инг}} = 2.3$  мкМ оказалась более чем на порядок ниже величины  $EC_{50_{инд}} = 46.9$  мкМ (рис. 2б).

Еще одним важным наблюдением являлась обратная зависимость выраженности кворум-ингибирующего эффекта производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-бензодиоксола от концентрации экзогенно вносимого химического аналога автоиндуктора  $C_6$ -АГЛ. При этом, в сравнении с описанной выше серией экспериментов, увеличение концентрации автоиндуктора с 0.001 до 0.01 мкМ требовало примерно десятикратного увеличения действующих концентраций тестируемых соединений, необходимых для 50% подавления биосинтеза виолацеина, а ее дальнейшее повышение до 0.1 мкМ приводило к частичной или полной отмене ингибирующего эффекта. Так значение  $EC_{50_{инг}}$  соединения 4, определенное в пробах с внесением 0.01 мкМ  $C_6$ -АГЛ, возросло до 19.7 мкМ, а увеличение концентрации автоиндуктора до 0.1 мкМ позволяло выявлять только фоновое проявление кворум-ингибирующей активности (рис. 2в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование библиотек химических соединений для последующего отбора соединений с различными вариантами биологической активности является современным направлением поиска потенциальных терапевтических агентов, в том числе

направленных на подавление “кворум сенсинга” бактериальных патогенов (Ravithj Singh et al., 2018). При этом основными задачами подобных исследований является анализ взаимоотношений “структура–активность” тестируемых соединений, а также отбор наиболее перспективных “кандидатных” молекул с целью их дальнейшего углубленного исследования (Fong et al., 2019). Настоящая работа развивает данное научное направление, ставя своей целью скрининг кворум-модулирующей активности в предварительно сформированной библиотеке производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-бензодиоксола, воспроизводящих отдельные элементы структуры *N*-гексаноил-*L*-гомосеринлактона ( $C_6$ -АГЛ) – автоиндуктора “кворум сенсинга” у *C. violaceum* (McClean et al., 1997).

Результаты проведенного скрининга позволили идентифицировать четыре соединения (3, 4, 5 и 12 на рис. 1), развивающие двунаправленную кворум-модулирующую активность: (i) при прямом тестировании на  $C_6$ -АГЛ-дефицитном штамме *C. violaceum* CV026 проявляющие свойства агонистов “кворум сенсинга”, (ii) в эксперименте с внесением экзогенного  $C_6$ -АГЛ демонстрирующие противоположную – антагонистическую активность. При этом наблюдаемые эффекты хорошо согласуются с представлениями о способности конкурентных ингибиторов ацилированных лактонов гомосерина слабо активировать систему “кворум сенсинга”, что первоначально было предсказано по результатам компьютерного моделирования (Anand et al., 2013), а в дальнейшем получило ряд экспериментальных подтверждений (Moore et al., 2015).

Предполагаемым механизмом агонистической активности соединений 3, 4, 5 и 12 является их функционирование в качестве  $C_6$ -АГЛ-мимикрирующих молекул (Galloway et al., 2012), при связывании с *N*-концевыми доменами гомодимера CviR трансформирующих его в “открытую” конформацию, способную к взаимодействию с соответствующими специфическими последовательностями ДНК на бактериальной хромосоме (Chen et al., 2011). Однако структурные отличия названных соединений от естественного автоиндуктора обуславливают относительно слабый характер их кворум-индуцирующей активности, на четыре порядка уступающей таковой у  $C_6$ -АГЛ как следствия сниженной афинности к белку CviR. Эта же модель позволяет объяснить и природу антагонистической активности соединений 3, 4, 5 и 12: одновременное связывание одной подобной молекулы и одной молекулы  $C_6$ -АГЛ с гомодимером CviR приводит к искажению его “открытой” конформации с утратой способности к взаимодействию со специфическими последовательностями на бактериальной ДНК. Дополнительным аргументом в пользу предложенного ме-

ханизма кворум-модулирующей активности производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-бензодиоксиола является более чем двукратное превышение концентраций соединений, требуемых для индукции “кворум сенсинга”, в сравнении с концентрациями, достаточными для его ингибирования. Об этом же свидетельствует нивелирование антагонистического эффекта исследованных соединений в присутствии высоких концентраций *C*<sub>6</sub>-АГЛ вследствие конкуренции между ними как молекулами с низкой и высокой афинностью к белку CviR.

Следует отдельно отметить, что описанный в настоящей работе характер биологической активности соединений 3, 4, 5 и 12 не соответствует ни одной из четырех известных классификационных групп модуляторов “кворум сенсинга” (Welsh, Blackwell, 2016), в связи с чем они должны быть обозначены как представители особой группы “концентрационно-зависимых агонистов/антагонистов”.

Анализ “структура–активность” позволил определить ряд условий, необходимых для проявления обнаруженного двунаправленного кворум-модулирующего эффекта. В первую очередь – это консервативность строения неполярного радикала у соединений 3, 4, 5, полностью идентичного данному участку в молекуле естественного аутоиндуктора *C*<sub>6</sub>-АГЛ, или его минимальная структурная модификация у соединения 12, сохраняющая стереохимическое соответствие гидрофобному карману на N-концевом домене белка CviR (<https://www.uniprot.org/uniprot/D3W065>). В свою очередь, структурные ограничения для полярных циклических группировок анализируемых молекул определялись наличием в их составе от 3 до 7 атомов углерода, а также 1 или 2 атомов кислорода, азота или серы.

Еще два производных *N*-гексанамида (соединения 8, 9) и три производных 2*H*-1,3-бензодиоксиола (соединения 11, 13 и 15) в тесте на *C. violaceum* CV026 обуславливали только ингибирование кворум-зависимого биосинтеза виолацеина, в соответствии с чем могли быть классифицированы как “истинные антагонисты” (Welsh, Blackwell, 2016). Вероятный механизм их активности также заключался в конкурентном препятствовании формированию правильной “открытой конформации” гомодимера белка CviR, но в сравнении с представителями первой группы соединений (3, 4, 5 и 12) требовал использования более высоких действующих концентраций.

Структурные ограничения для этих молекул были менее жесткими и допускали наличие в их составе различных по структуре неполярных углеводородных радикалов из 5–8 атомов углерода, а также расширенного перечня полярных циклических группировок, включающих производные

тиофена. Однако следствием такой модификации было вероятное снижение афинности к белку CviR, что в контексте поставленной задачи оценивалось как нежелательное явление.

В качестве же наиболее перспективного соединения, выявленного в результате проведенного скрининга, следует назвать *N*-(1,3-бензодиоксиол-5-ил)-гексанамид, который является новым структурно отличным от АГЛ модулятором “кворум сенсинга” и может быть рекомендован для проведения дальнейших углубленных исследований в системах *in silico*, *in vitro* и *in vivo*.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №16-16-10048).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов тестирования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anand R., Rai N., Thattai M. Interactions among quorum sensing inhibitors // PLoS One. 2013. V. 8. Article e62254.
- Bassler B.L., Losick R. Bacterially speaking // Cell. 2006. V. 125. P. 237–246.
- Blosser R.S., Gray K.M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers // Microbiol. Methods. 2000. V. 40. P. 47–55.
- Case R.J., Labbate M., Kjelleberg S. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the *Proteobacteria* // ISME J. 2008. V. 2. P. 345–349.
- Chen G., Swem L.R., Swem D.L., Stauff D.L., O’Loughlin C.T., Jeffrey P.D., Bassler B.L., Hughson F.M. A strategy for antagonizing quorum sensing // Mol. Cell. 2011. V. 42. P. 199–209.
- Chen X., Zhang L., Zhang M., Liu H., Lu P., Lin K. Quorum sensing inhibitors: a patent review (2014–2018) // Expert Opin. Ther. Pat. 2018. V. 28. P. 849–865.
- Fong J., Mortensen K.T., Nørskov A., Qvortrup K., Yang L., Tan C.H., Nielsen T.E., Givskov M. Itaconimides as novel quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* // Front. Cell Infect. Microbiol. 2019. V. 8. P. 443.
- Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S., Welch M., Spring D.R. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria // Trends Microbiol. 2012. V. 20. P. 449–458.
- Geske G.D., O’Neill J.C., Blackwell H.E. Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues



that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria // Chem. Soc. Rev. 2008. V. 37. P. 1432–1447.

McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology (SGM). 1997. V. 143. P. 3703–3711.

Moore J.D., Rossi F.M., Welsh M.A., Nyffeler K.E., Blackwell H.E. A comparative analysis of synthetic Quorum Sensing modulators in *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into mechanism, active efflux susceptibility, phenotypic response, and next-generation ligand design // J. Am. Chem. Soc. 2015. V. 137. P. 14626–14639.

Papenfors K., Bassler B.L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. P. 576–588.

Ravithaj Singh L., Tripathi V.C., Raj S., Kumar A., Gupta S., Horam S., Upadhyay A., Kushwaha P., Arockiaraj J., Sashidhara K.V., Pasupuleti M. In-house chemical library repurposing: A case example for *Pseudomonas aeruginosa* antibiofilm activity and quorum sensing inhibition // Drug Dev. Res. 2018. V. 79. P. 383–390.

Rémy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabrière E., Daudé D. Interference in bacterial Quorum Sensing: a biopharmaceutical perspective // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 203.

Sanchez C., Brana A.F., Mendez C., Salas J.A. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis // ChemBiochem. 2006. V. 7. P. 1231–1240.

Stauff D.L., Bassler B.L. Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3871–3878.

von Bodman S.B., Willey J.M., Diggle S.P. Cell-cell communication in bacteria: united we stand // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 4377–4391.

Welsh M.A., Blackwell H.E. Chemical probes of quorum sensing: from compound development to biological discovery // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. P. 774–794.

Zhang R.G., Pappas K.M., Brace J.L., Miller P.C., Oulmassov T., Molyneaux J.M., Anderson J.C., Bashkin J.K., Winans S.C., Joachimiak A. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA // Nature. 2002. V. 417. P. 971–974.

## Screening of *N*-Hexanamide and 2*H*-1,3-Benzodioxol Derivatives for Quorum Sensing Modulation in *Chromobacterium violaceum*

D. G. Deryabin<sup>1, \*</sup>, A. A. Galadzhieva<sup>2</sup>, and G. K. Duskaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Scientific Center of Biological Systems and Agrotechnologies, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia

<sup>2</sup>Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia

\*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Received March 1, 2020; revised May 15, 2020; accepted May 30, 2020

The aim of the study was screening of chemical compounds library to find “quorum sensing” modulators in proteobacteria. The library included 19 molecules that contained the *N*-hexanamide non-polar radical or the 2*H*-1,3-benzodioxole polar heterocyclic group, which were partially identical to the natural autoinducer *N*-hexanoyl homoserine lactone (C<sub>6</sub>-AHL) chemical structure. The *Chromobacterium violaceum* CV026 (NCTC 13278) was used in “quorum sensing” modulation biotests. This biosensor strain is defective in the natural autoinducer C<sub>6</sub>-AHL biosynthesis, but contains the functional homodimeric protein CviR, which, after two C<sub>6</sub>-AHL molecules reception, activates the previously silent genes transcription, including the *vioABCDE* operon, which leads to the production of the blue-violet pigment violacein. The direct screening showed agonistic (violacein-inducing) activity in 4 compounds and the screening variant in presence of exogenously introduced C<sub>6</sub>-AHL indicated the antagonistic (violacein-inhibiting) activity in 9 tested compounds. Interestingly, the most pronounced antagonistic activity was found in molecules that proved to be C<sub>6</sub>-AHL agonists. Significantly, the effective concentrations of these compounds required for 50% violacein inhibition were 3.2–20.4-fold lower than ones causing 50% violacein induction. In addition, the absolute concentrations of the active compounds necessary for the induction of violacein were much higher than that of a natural autoinducer, and the degree of their inhibitory effect was inversely related to the concentration of C<sub>6</sub>-AHL exogenously introduced into the biotest. According to the screening results, *N*-1,3-benzodioxol-5-yl-oxohexanamide was identified as the most effective “quorum sensing” modulator, submitted for further *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies.

**Keywords:** quorum sensing, autoinducers, *Chromobacterium violaceum*, CviR, agonists, antagonists