

Ciklodextrin-modulált kvórum csillapítás – α -ciklodextrinek bakteriális kommunikációra gyakorolt hatásának vizsgálata *Aliivibrio fischeri* modellrendszerben

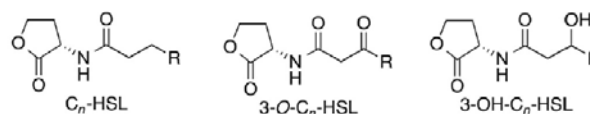
BERKL Zsófia,^{a*} VARGA Erzsébet,^b FENYVESI Éva,^b SZENTE Lajos^b és MOLNÁR Mónika^{a*}

^aBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

^bCycloLab Ciklodextrin Kutató-fejlesztő Kft., Illatos út 7., 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A baktériumoknak az első sejtek megjelenésétől kezdve kiemelt szerepük volt a bioszféra alakításában, illetve a magasabb rendű élőlények evolúciójában. Napjainkban is vírusokkal, eukarióta egysejtűekkel, valamint magasabb rendű élőlényekkel komplex közösséget alkotva, azokkal folyamatos kommunikációs kapcsolatot fenntartva élnek. Ehhez, illetve a fajon belüli interakciókhoz a változatos szerkezetű szignál molekulák termelésén és detektálásán alapuló, sejtsűrűségtől függő mechanizmust, a bakteriális kommunikációt, vagy más néven kvórum érzékelést használják.¹ A kvórum érzékelés (quorum sensing, QS) az együttműködés kialakítására képes baktérium populációk sejtsűrűségtől függő inger-válasz rendszere, amely kis molekulású szignálok (autoinducerek, AI-k) termelésén, detektálásán, illetve az ezek által kiváltott génexpresszióan alapul.² A baktériumok folyamatosan, kis mennyiségben termelik a szignálokat, amelyek a sejtfalon át a környezetbe jutnak, majd egy másik baktérium megfelelő receptorához kötődve azzal komplexet képeznek. A populáció sejtszámának növekedésével a receptorok fokozatosan telítődnek, amíg a szignál-receptor komplexek koncentrációja eléri egy küszöbértéket. Ekkor egyrészt a szignál termelése intenzívebbé válik (autoindukció történik), másrészt a sejtekben egyes célgének átíródnak, amelynek köszönhetően a populáció új tulajdonságokra tesz szert.³ Ilyen tulajdonság többek között a fénykibocsátás (biolumineszcencia), a rajzó vagy úszó mozgás, a biofilmképzés, a sporuláció, különböző másodlagos anyagszerek termelése, a fajon belüli fenotípusos heterogenitás, valamint a különböző virulencia faktorok megjelenése is. Ezek a kvórum érzékelés által irányított tulajdonságok mind a faj túlélését, a gyorsan változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodását, esetleg a fertőzőképesség javulását szolgálják.⁴ A baktériumok számos különböző eredetű és szerkezetű szignál molekulát termelnek, amelyek közül – főként a Gram-negatív proteobaktériumok körében – az *N*-acil-homoszerin lakton (AHL) típusú molekulák a legelterjedtebbek.⁵ Az AHL szignálmolekulák egy, az α -pozícióban lévő szénatomon laktonizált homoszerin gyűrűből, illetve egy C4–C18 hosszúságú acilláncból állnak, amelyeket egy amidkötés kapcsol össze (1. ábra).⁶



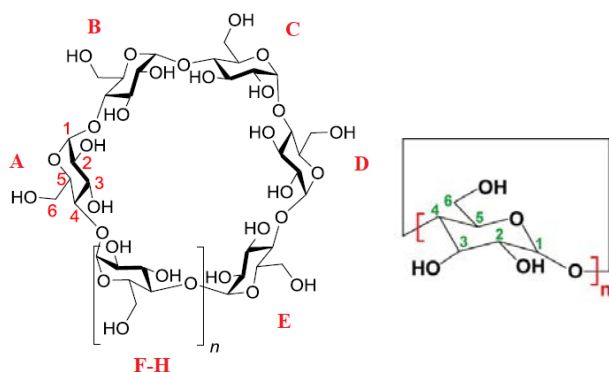
1. Ábra. Az *N*-acil-homoszerin szignálok különféle típusai.⁷

Napjaink egyik sürgető problémája a multidrog rezisztencia terjedése a patogén baktériumok között. Az Amerikai Járványügyi és Betegségmegelőzési Központ adatai szerint világszerte évente körülbelül 700 000 halálesetért felelősek ezek a fajok.⁸ Ezt leggyakrabban az antibiotikumok hatásának javításával (adjuvánsok adagolásával) vagy azok alternatív módszerekkel való kiváltásával próbálják orvosolni. A lehetséges alternatívák közé tartozik a sejtfunkciók bakteriofágokkal való zavarása, a természetes eredetű, antibakteriális anyagok alkalmazása; illetve az egyes virulencia faktorok irányításáért kvórum érzékelés folyamatának gátlása.^{9,10} A kvórum érzékelés gátlása, azaz a kvórum csillapítás (quorum quenching, QQ) több, eltérő megközelítésű módszert foglal magába, amelyek közös jellemzője, hogy nem pusztítják el vagy helyezik szelekciós nyomás alá a baktériumot, csupán a sejtek közti kommunikációt akadályozzák meg. Ezáltal a kvórum érzékelés által irányított, fertőzőképességért felelős tulajdonságok nem jelennek meg, az újszerű megközelítésnek köszönhetően pedig várhatóan csökken a rezisztencia kialakulásának valószínűsége.¹¹ Ilyen módszer többek között a szignál molekulák vagy a receptorok enzimikus degradációja, a szignálok QS-inaktív szerkezeti analógokkal való helyettesítése, valamint ezek molekuláris kapszulázása is.^{12,13} A szignálok egészének vagy egy részének kapszulázására többek között alkalmasak a természetben is megtalálható, de a keményítő hidrolízisével ipari körülmények között is előállítható ciklodextrinek.

A ciklodextrinek (CD-k) ciklikus glükóz egységekből felépülő, nem redukáló oligoszacharidok (2. ábra). Gyűrűs szerkezetű molekulák, amelyeknek három natív típusa – az α -CD (ACD), a β -CD (BCD) és a γ -CD (GCD) – számos szubsztituált származéka és változatos szerkezetű polimerje ismert.¹⁴ Különleges szerkezetükből, illetve kettős

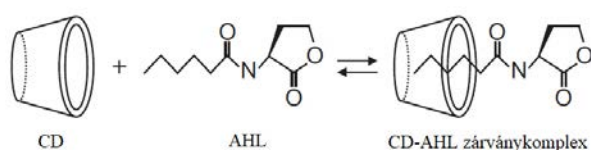
* Tel.: +36 (1) 463 2347; e-mail: molnar.monika@vbk.bme.hu, berkl.zsofia@vbk.bme.hu

polaritásukból adódóan vizes közegben a ciklodextrinek képesek az üregükben reverzibilisen megkötni megfelelő méretű molekulákat vagy molekula részeket, vagyis azzal zárványkomplexet képezni.^{15,16} Ezen asszociációs komplex képződése dinamikus egyensúlyra vezető, reverzibilis folyamat, amelynek eredményeképpen a vendég molekula tulajdonságai a szabad állapotához képest megváltoznak, míg a ciklodextrin szerkezete – enyhe alakváltozáson kívül – változatlan marad.¹⁷ Ezen különleges tulajdonságuknak köszönhetően napjainkban széles körben alkalmazzák a ciklodextrinek a gyógyászat, az ipar, a mezőgazdaság, illetve a környezetvédelem számos területén.^{18,19}



2. Ábra. A natív ciklodextrinek általános felépítése (balra) és az őket alkotó glükopiranoz egységek szerkezete (jobbra); az ACD esetén $n=1$, a BCD esetén $n=2$, a GCD esetén pedig $n=3$.^{19,20}

A ciklodextrinek egyik legújabb – és a kutatásunk szempontjából legfontosabb – alkalmazási területe a kvórum érzékelés befolyásolása. A ciklodextrinek képesek molekuláris csapdaként az üregükbe zárni a Gram-negatív baktériumok által termelt AHL szignál molekulák apoláris acil oldalláncát (3. ábra), ezzel megakadályozva azok receptorokhoz való kötődését. Így hiába nő a populáció sejtszáma és a szignálok mennyisége a környezetben, a baktériumok receptorai nem telítődnek, azaz a szignál-receptor komplexek koncentrációja nem haladja meg azt a kritikus értéket, amely a gének átíródásához szükséges. Ezáltal az adott génnek által kódolt, tehát közvetve a kvórum érzékelés irányítása alatt álló tulajdonságok sem jelennek meg a populációban.^{21,22} Jelenlegi ismereteink szerint a natív ciklodextrinek, ezek származékai, valamint polimerjei is képesek nem-specifikusan komplexálni az AHL szignálok acil oldalláncát, de a létrejött 1:1 CD:AHL sztöchiometriájú zárványkomplex stabilitása a ciklodextrin molekulák egyedi tulajdonságaitól, az acillánc hosszától és szubsztituáltságától, valamint a kísérleti körülményektől függően eltérő lehet.^{23,24}



3. Ábra. A ciklodextrin (CD), az AHL szignál és a zárványkomplex.²⁵

2. Célkitűzések

A zárványkomplex képzés révén megvalósuló kvórum csillapítás a kvórum érzékelés által irányított tulajdonságokban bekövetkező változások mérésével nyomon követhető, ezáltal pedig a különböző ciklodextrinek kvórum csillapító hatása (QQ aktivitása) számszerűsíthető, értékelhető és összehasonlítható. Ennek nyomán kutatásunkban célul tűztük ki többek között különböző α -ciklodextrinek kvórum érzékelésre gyakorolt hatásának szisztematikus felmérését, illetve összehasonlítható értékelését. Modellorganizmusként a Gram-negatív, fakultatív anaerob, sósvízi *Aliivibrio fischeri* baktériumot választottuk ki (4. ábra), amely a mikrobiológiai, ökotoxikológiai kutatások, valamint a baktériumok és gazdaszervezetek közötti kölcsönhatások vizsgálatának régóta eredményesen használt tesztorganizmusa. A faj jellegzetes, kvórum érzékelés által irányított tulajdonsága a biolumineszcencia, amely szimbiota és szabadon élő sejtek esetében egyaránt megjelenik.²⁶ Elsődleges célunk volt az expozíciós idő, valamint a ciklodextrinek koncentrációjának, szerkezetének és az ebből adódó fizikai-kémiai tulajdonságainak potenciális QQ aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata. Ehhez rövid távú (akut), kis térfogatú és statikus kísérleti elrendezésben követtük a natív ACD, ennek különféleképpen szubsztituált származékainak, valamint epiklóridinnel térhálósított polimerjének kvórum érzékelésre (biolumineszcenciára) gyakorolt hatását. Ezután a biológiai rendszerekben, ciklodextrinek jelenlétében zajló komplex folyamatok feltárása érdekében további, hosszú távú (krónikus) kísérleteket végeztünk. Ezek során a natív ACD, valamint az *N*-(3-oxo-hexanoil)-l-homoszerin lakton (OHHL) szignál molekula biolumineszcenciára gyakorolt önálló és kombinált hatását vizsgáltuk nagy térfogatú, dinamikus kísérleti elrendezésben. Emellett ebben a tesztrendszerben meghatároztuk az *A. fischeri* esetében kulcsfontosságú AHL szignál molekulák – az *N*-hexanoil-l-homoszerin lakton (HHL), az *N*-(3-oxo-hexanoil)-l-homoszerin lakton (OHHL) és az *N*-oktanoil-l-homoszerin lakton (OHSL) – koncentrációját is. Ebben az esetben azt kívántuk felmérni, hogy a korábbi kísérletben nagy QQ aktivitást mutató ACD képes-e mesterségesen intenzifikált kommunikáció esetén is QQ hatást kifejteni, tehát kompenzálni a kívülről adagolt (exogén) szignál serkentő hatását.



4. Ábra. Biolumineszkáló, 16 órás *A. fischeri* kultúra lombikban (jobbra) és biolumineszkáló baktérium sejtek (balra).

3. Eredmények

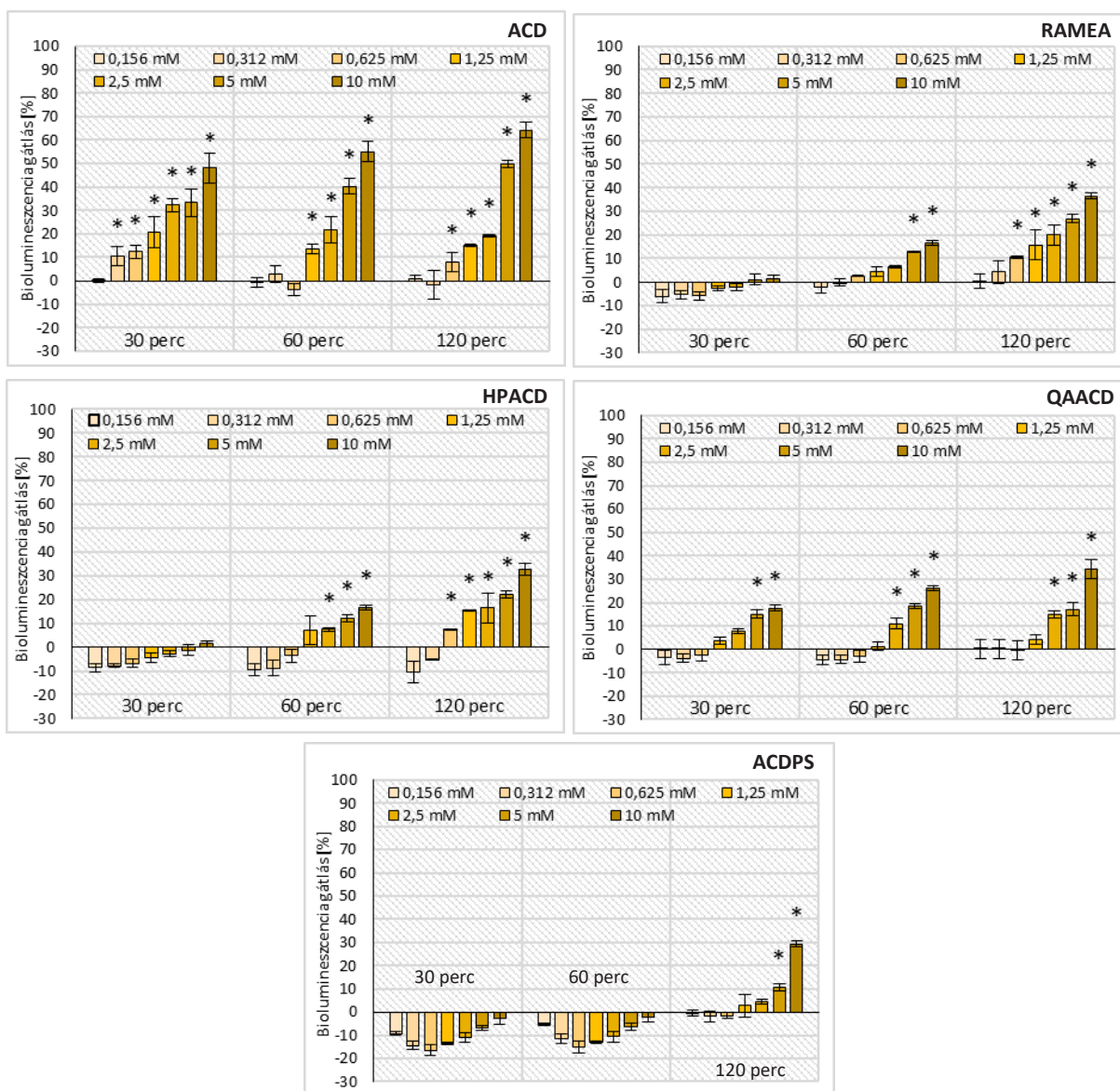
A következőkben bemutatott ábrákon az expozíciós idő, valamint a ciklodextrin koncentráció függvényében ábrázoltuk a biolumineszcenciára gyakorolt, kontrollhoz viszonyított átlagos gátló hatást (%) vagy relatív biolumineszcencia értékeket. Az egyutas és ismételt mérés varianciaanalízis (ANOVA és RM-ANOVA, $p < 0,05$) eredményei alapján a diagramokon csillaggal (*) jelöltük az adott időpontban a kontrolltól való szignifikáns eltérést.

3.1. Az α -ciklodextrinek hatásának vizsgálata

Az 5. ábra 0,156–10 mM natív ACD, random-metilezett-ACD (RAMEA), 2-hidroxipropil-ACD (HPACD), tri-

metil-aminopropil-ACD (QAACD), valamint térhálós ACD polimer (ACDPS) fénykibocsátásra gyakorolt hatását szemlélteti 30–120 perc expozíció után, exponenciális szaporodási szakaszban lévő baktérium tenyészet esetén.

Az α -ciklodextrinek a legtöbb esetben a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkentették a biolumineszcencia intenzitást, ez a hatásuk pedig az idő előrehaladtával és a koncentrációval – bár származékanként eltérő mértékben – nőtt. A legjelentősebb kvórum csillapító hatást (64%, 120 perc) 10 mM ACD váltotta ki, de ez a natív változat már 0,312 mM (30 perc) és 0,625 mM (120 perc) koncentrációban is szignifikánsan csökkentette a fénykibocsátást. Az egyéb α -ciklodextrinek gátló hatása egyik esetben sem érte el a 40%-ot.



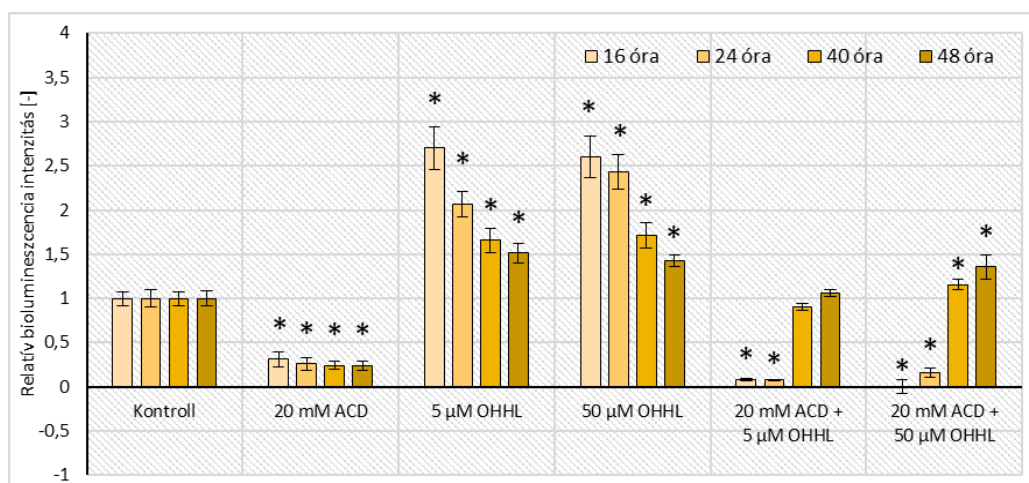
5. Ábra. Az α -ciklodextrinek hatása az *A. fischeri* biolumineszcenciájára. ACD: natív α -ciklodextrin, RAMEA: random-metilezett-ACD (DS=11), HPACD: 2-hidroxipropil-ACD (DS=4,6), QAACD: trimetil-aminopropil-ACD (DS=2,5–4), ACDPS: epiklórhidrinrel térhálósított ACD polimer. A csillagok az adott időpontban a desztillált vizes kontrolltól való szignifikáns különbséget jelölik.

3.2. A natív ACD és az OHHL szignál kombinált hatásának vizsgálata

A 6. ábra a kontrollhoz viszonyított, relatív biolumineszcencia intenzitást szemlélteti 20 mM natív ACD, 5 és 50 μ M *N*-(3-oxo-hexanoil)-*L*-homoszerin lakton (OHHL) szignál molekula, valamint ezek kombinációinak jelenlétében, 16–48 óra expozíció után, exponenciális szaporodási szakaszban lévő tenyészet esetén.

Az ACD önmagában mind a négy időpontban a kontrollhoz képest szignifikáns, 69–79%-os gátló hatást mutatott. A várakozásoknak megfelelően az OHHL szignál molekula koncentrációtól függetlenül szignifikánsan, 42–170%-kal serkentette a fénykibocsátást. 5 és 50 μ M OHHL esetében látható a hatás időbeli csökkenése, amelynek oka feltehetően az, hogy az exogén szignál molekula a QS folyamatok szabályozásával további szignálok termelését indukálta. Emellett a biolumineszcencia időbeli csökkenésében a negatív visszacsatolási mechanizmusok is szerepet játszhatnak: kezdetben az exogén OHHL pozitív visszacsatolási rendszerben indukálta további szignálok termelődését, ugyanakkor lehetnek a rendszerben olyan típusú AHL receptorok is, amelyek transzkripcióss represszorként működnek. Az AHL szignál molekulák (itt az OHHL) ezen receptorhoz való kötődése pedig negatívan szabályozza a génrepressziót.²⁷

Az ACD és az OHHL együttes adagolása esetén az ACD QS gátló hatása ellensúlyozta a szignál QS serkentő hatását: 16 és 24 óra expozíció után 5 és 50 μ M OHHL jelenlétében is a kontrollhoz képest szignifikáns, 78–92%-os csökkenés volt megfigyelhető a biolumineszcenciában. Ez a gátló hatás idővel csökkent, 20 mM ACD és 5 μ M OHHL esetén 40 és 48 óra után már nem volt jelentős hatása a molekulák kombinációjának, 20 mM ACD és 50 μ M OHHL esetén pedig szignifikáns, maximum 36%-os serkentést tapasztaltunk. Ennek az lehetett az oka, hogy 40 óra után a szignál molekulák feldúsultak a rendszerben, koncentrációjuk olyan mértékben megnőtt, amelyet az ACD már nem volt képes elegendő mennyiségben komplexálni ahhoz, hogy gátolja a QS folyamatokat. De ebben szerepe lehet az exogén OHHL és az ACD más szignál molekulákra gyakorolt hatásának is. Ahogy a rendelkezésre álló szakirodalom is leírja, az *A. fischeri* biolumineszcenciája elsődlegesen a LuxI/LuxR QS rendszer irányítása alatt áll, amelynek az elmúlt években több szignál molekuláját is kimutatták. Ugyanakkor beszámolnak arról is, hogy ezen felül két, párhuzamosan működő QS útvonal (AinS/AinR, LuxS/LuxP/LuxQ) is ismert, amelyek között szintén hierarchikus szabályozás valósulhat meg.²⁸ Ebben a komplex rendszerben számos folyamatot befolyásolhat mind a ciklodextrin, mind az exogén szignál jelenléte.



6. Ábra. Az ACD, OHHL, illetve ezek kombinációjának hatása az *A. fischeri* biolumineszcenciájára (ACD: natív α -ciklodextrin, OHHL: *N*-(3-oxo-hexanoil)-*L*-homoszerin lakton szignál; a csillagok az adott időpontban a kontrolltól való szignifikáns különbséget jelölik).

3.3. Az AHL szignálok koncentrációjának vizsgálata

Az 1. táblázat az *N*-hexanoil-*L*-homoszerin lakton (HHL), az *N*-(3-oxo-hexanoil)-*L*-homoszerin lakton (OHHL), illetve az *N*-oktanoil-*L*-homoszerin lakton (OHSL) szignál molekulák HPLC-MS/MS technikával meghatározott koncentrációját szemlélteti, 20 mM natív ACD, 5 vagy 50 μ M OHHL, valamint ezek kombinációinak jelenlétében. A szignálok koncentrációját 24 és 48 óra expozíció után, exponenciális szaporodási szakaszban lévő tenyészet esetén határoztuk meg.

3.3.1. *N*-hexanoil-*L*-homoszerin lakton (HHL)

A mikrobiológiai kísérletek során mind az ACD, mind pedig az exogén OHHL negatívan befolyásolta a HHL koncentrációját, de ez a hatás az ACD esetében erőteljesebb volt. 24 óra után csak a kontroll és az 5 μ M OHHL-t tartalmazó mintában tapasztaltunk HHL képződést. 48 óra után az ACD-t tartalmazó mintákban továbbra sem képződött HHL, az OHHL-lel kezelt minták HHL tartalma pedig 37–41%-kal volt kisebb, mint a kontroll mintáé. Az ACD és OHHL együttes jelenlétében a kontrollhoz képest 97–98%-kal kisebb volt a HHL koncentráció.

3.3.2. *N*-(3-oxo-hexanoil)-l-homoszerin lakton (OHHL)

A szakirodalom által több helyen a biolumineszcencia fő szignáljaként leírt OHHL szinte kizárólag akkor volt jelen, ha azt mesterségesen adtuk hozzá a tesztközeghez. Ez arra utal, hogy a tesztelt *A. fischeri* ATCC 49387 törzs esetén nem elsődleges szerepű ez a molekula (nem endogén szignál), tehát feltehetően a baktérium nem termeli az alapvető fiziológiai folyamatai során. Az 5 és 50 μM (kb. 1070 és 10700 ng/ml) exogén OHHL szignál hatását vizsgáló mintákban, az idő előrehaladtával és a koncentrációval növekvő mennyiségű, maximum 73 és 487 ng/ml OHHL jelent meg, amely azt szemlélteti, hogy az exogén OHHL indukciós szereppel bírt, további szignál termelést kiváltva. 24 óra elteltével a szignál koncentráció 20 mM ACD és 5 μM OHHL hozzáadása esetén maximum 24 ng/ml, 20 mM ACD és 50 μM OHHL adagolása esetén pedig 245 ng/ml volt. Az ACD hozzáadása nélkül mért OHHL koncentrációkkal összevetve az ACD jelenléte ebben az időpontban nem befolyásolta a szignál molekula mennyiségét. Ugyanakkor 48 óra elteltével az ACD jelenlétében csaknem negyvened és harmincad részére csökkent az OHHL koncentrációja a tesztközegben. Az OHHL hiánya, valamint kis mennyisége a mintákban rendkívül érdekes eredmény, hiszen a visszamért koncentráció nagyságrendekkel kevesebb volt, mint az összeállítás során a kísérleti rendszerhez adott mennyiség. Alapvetően

az AHL szignálok a sejten kívüli térben is stabilak, viszont a közeg kémhatása és hőmérséklete befolyásolhatja az élet-tartamukat.²⁹ Ezen kívül a spontán laktonolízis is csökkentheti a koncentrációjukat.³⁰ Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy egyes Gram-negatív baktériumok a saját szignáljaik lebontására (és későbbi „újrahasznosítására”) is termelhetnek szubsztrát-specifikus laktonáz enzimeket.³¹ Ezek a folyamatok magyarázattal szolgálhatnak az OHHL kis koncentrációjára, ugyanakkor lehetséges, hogy más, eddig nem vizsgált vagy még nem ismert mechanizmusok húzódnak a háttérben.

3.3.3. *N*-oktanoil-l-homoszerin lakton (OHSL)

A kontroll mintához viszonyítva az ACD és az OHHL hozzáadása is negatívan befolyásolta az OHSL mennyiségét. 20 mM ACD jelenlétében több, mint 95%-kal kevesebb volt az OHSL, mint a kontroll mintákban. Az 5 és 50 μM OHHL-t tartalmazó mintákban pedig a kontrollhoz viszonyítva 37 és 43%-kal (24 óra), valamint 28 és 32%-kal (48 óra) kevesebb volt az OHSL koncentráció. Az ACD és az OHHL együttes adagolása esetén ez a hatás fokozottan érvényesült: 24 óra elteltével mindkét esetben megszűnt az OHSL szintézis, 48 óra után pedig több mint 95%-kal csökkent a kontrollhoz képest. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az OHHL és az OHSL között kompetitív inhibíció is fennállhat.³²

1. Táblázat. Az AHL szignálok koncentrációja (ng/ml) az ACD és OHHL különböző kombinációinak hatását vizsgáló kísérletben.

	Kontroll	20 mM ACD	5 μM OHHL	50 μM OHHL	20 mM ACD + 5 μM OHHL	20 mM ACD + 5 μM OHHL
24 óra						
HHL [ng/ml]	6,0 $\pm$ 0,6	<i>n.a.</i>	3,3 $\pm$ 0,2	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
OHHL [ng/ml]	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	25,5 $\pm$ 4,3	222,6 $\pm$ 17,9	23,9 $\pm$ 0,5	245,5 $\pm$ 39,2
OHSL [ng/ml]	122,2 $\pm$ 10,6	2,5 $\pm$ 0,2	74,7 $\pm$ 4,4	70,0 $\pm$ 2,0	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
48 óra						
HHL [ng/ml]	29,0 $\pm$ 4,7	<i>n.a.</i>	18,2 $\pm$ 2,7	17,0 $\pm$ 1,5	0,8 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2
OHHL [ng/ml]	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	73,1 $\pm$ 10,3	486,7 $\pm$ 45,1	2,2 $\pm$ 0,2	12,9 $\pm$ 1,8
OHSL [ng/ml]	378,2 $\pm$ 37,8	52,6 $\pm$ 0,9	271,7 $\pm$ 33,8	256,7 $\pm$ 5,0	16,7 $\pm$ 2,9	18,2 $\pm$ 3,0

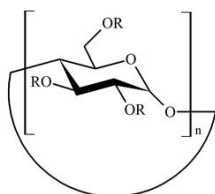
^a *n.a.*: nincs adat, nem volt mérhető mennyiségű szignál molekula.

Összességében a HHL és az OHSL szignálok változó koncentrációban, de mindegyik kontroll mintában előfordultak, az OHHL – eltérően néhány, a szakirodalomban megjelent kutatás eredményeitől – viszont csak akkor volt detektálható, ha azt mesterségesen adtuk hozzá a tesztközeghez. Ez az eredmény előállhatott a korábban már ismertetett okok – a kísérleti rendszer kémhatásának és hőmérsékletének változása, a laktonolízis, valamint szubsztrát-specifikus laktonázok termelése – miatt, illetve a QS folyamat különböző szakaszaiban termelt szignálok közötti mennyiségi és

minőségi eltérés miatt is. Az *A. fischeri* kvórum érzékelő rendszere jól szemlélteti, hogy egy-egy fenotípusos tulajdonság megjelenésének szabályozásában több QS útvonal is kölcsönhatásba léphet egymással. Ez a kölcsönhatás pedig olyan komplex rendszert alkot, amely aligha érthető meg teljeskörűen az eddigi eredményeink alapján, tehát a kvórum érzékelés működése további – köztük molekuláris szintű – feltáró vizsgálatokat, valamint matematikai elemzést igényel.

4. Kísérleti metodika

A kísérletek során alkalmazott *Aliivibrio fischeri* (ATCC 49387, DSM 7151) törzset a Hach Magyarország Kft.-től, a szignál molekulákat a Merck Life Science Kft.-től szereztük be. A ciklodextrineket (7. ábra) a Cyclolab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Kft. bocsátotta a rendelkezésünkre.



Natív CD	n = 6, 7 vagy 8	R = -H
Random-metilzett CD	n = 6, 7 vagy 8	R = -H -CH ₃
Trimetil-aminopropil-CD	n = 6, 7 vagy 8	R = -H -CH ₂ CH(OH)CH ₂ N(CH ₃) ₃ ⁺ Cl ⁻
2-hidroxipropil-CD	n = 6, 7 vagy 8	R = -H -CH ₂ CH(OH)CH ₃
Szulfobutil-éter-CD	n = 6, 7 vagy 8	R = -H -(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺
CD polimerek	n = 6, 7 vagy 8	R = -H -CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH -CH ₂ CH(OH)CH ₂ O-CD

7. Ábra. A kutatás során vizsgált ciklodextrinek (CD-k) szerkezete.

4.1. Az α -ciklodextrinek hatásának vizsgálata

Ebben a kísérletsorozatban az α -ciklodextrinek *A. fischeri* biolumineszcenciájára gyakorolt hatását 0,156–10 mM koncentrációban, kis térfogatban (mikrotitrátor lemezben, 250 μ l), nagy áteresztőképességű módszer alkalmazásával vizsgáltuk. A biolumineszcencia intenzitását 0, 30, 60 és 120 perc expozíció után, FLUOstar OPTIMA multifunkciós mikrotitrátor lemez olvasóval mértük. A mérések között a mintákat 22 °C-on, sötétben inkubáltuk. A ciklodextrinek kvórum csillapító hatását a kontrollhoz (desztillált víz) viszonyított gátló hatásukkal jellemeztük. Az adatok szignifikanciáját a TIBCO Statistica 13.5 szoftver segítségével, egyutas és ismételt mérés varianciaanalízissel ($p < 0,05$) ellenőriztük.

4.2. A natív ACD és az OHHL szignál kombinált hatásának vizsgálata

A kutatás ezen fázisában 20 mM natív ACD, valamint 5 és 50 μ M *N*-(3-oxo-hexanoil)-l-homoszerin lakton (OHHL) biolumineszcenciára gyakorolt hatását nagy térfogatban (100 ml), rázatott lombikos kísérletben mértük fel. A lombikokból az összeállítás után követlenül, majd 16, 24, 40 és 48 óra elteltével mikrotitrátor lemezekbe 200 μ l mintát vettünk, több párhuzamosban. A mintavételek között a lombikokat 22 °C-on, sötétben, 110 rpm intenzitással rázatva inkubáltuk. A méréseket és az adatok értékelését a 4.1. fejezetben leírtak szerint végeztük el.

4.3. Az AHL szignálok koncentrációjának vizsgálata

A 4.2. fejezetben leírt biológiai kísérlet során, 24 és 48 óra expozíció után 10–10 ml homogén mintát vettünk a lombikokból. A mintákat centrifugáltuk, majd az alsó fázisból kivett 5 ml-hez 5 ml kloroformot adtunk. Egy éjszakán át kevertettük az elegyet. Ezután a kloroformos fázisból 1 ml-t 70 °C-on beszáritottunk, majd 1 ml acetonnitrilben visszaoldottuk. Az előkészített mintákat injektáltuk a HPLC-MS/MS készülékbe. A mérések 25 °C-on, Kinetex C18 oszlop alkalmazásával, 0,7 ml/perc sebességű gradiens áramlással zajlottak.

5. Összefoglalás

Az eredményeink alapján egyes α -ciklodextrinek képesek a kvórum érzékelés és az ezáltal irányított folyamatok hatékony befolyásolására, feltehetően a kvórum csillapító hatásuknak köszönhetően. Ez elsősorban arra vezethető vissza, hogy a baktériumok AHL szignál molekuláival zárványkomplexet képeznek, így megakadályozzák a QS útvonal elindulásához szükséges specifikus szignál-receptor komplexek létrejöttét. A kvórum csillapító hatásuk mértékét azonban számos tényező befolyásolja. Többek között az expozíciós idő, a ciklodextrin molekula szerkezete – a monomer vagy polimer karaktere, szubsztituáltsága, töltése és üregmérete – az ebből adódó tulajdonságai – a struktúra rugalmassága, az oldhatósága és az aggregátum képzésre való hajlandósága – valamint a ciklodextrin koncentráció is.

A felmerült, még megválaszolatlan kérdések ellenére kijelenthető, hogy a ciklodextrin-modulált kvórum csillapítás egy ígéretes biotechnológiai stratégia, amely hosszú távon célspecifikusan tervezett ciklodextrin-alapú csapdák alapja lehet. Ezen innovatív molekuláris csapdák széleskörű alkalmazása a gyógyászat, a mezőgazdaság, az ipar és a környezetvédelem területén fordulatot hozhat a multidrog rezisztens baktériumok, valamint az ezek által képzett biofilmek és megbetegedések elleni küzdelemben.

Köszönetnyilvánítás

Az itt bemutatott kutatás a Kulturális és Innovációs Minisztérium, valamint a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal OTKA pályázati programjának K_17 125093 projektjének, valamint TKP2021 pályázati programjának BME-EGA-02 projektjének finanszírozásában valósult meg.

Hivatkozások

1. Abisado, R. G.; Benomar, S.; Klaus, J. R.; Dandekar, A. A.; Chandlera, J. R. *mBio* **2018**, 9(3) e02331-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02331-17>
2. Waters, C. M.; Bassler, B. L. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
3. Banerji, R.; Kanojiya, P.; Saroj, S. D. *Crit. Rev. Microbiol.* **2020**, 46(2), 136–146. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1735991>
4. Wu, L.; Luo, Y. *Front. Microbiol.* **2021**, 12, 611413. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611413>
5. Papenfort, K.; Bassler, B. L. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, 14, 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
6. Lade, H.; Paul, D.; Kweon, J. H. *BioMed Res. Int.* **2014**, 162584. <https://doi.org/10.1155/2014/162584>
7. Yajima, A. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2016**, 47, 331–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63603-4.00010-3>
8. Breijyeh, Z.; Jubeh, B.; Karaman, R. *Molecules* **2020**, 25, 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
9. Sala, G. D.; Teta, R.; Esposito, G.; Costantino, V. In *Quorum sensing – molecular mechanism and biotechnological application*; Tommonaro, G., Ed.; Academic Press of Elsevier: London, **2019**; pp 3–28.
10. Weiland-Bräuer, N.; Malek, I.; Schmitz, R. A. *PLOS One* **2019**, 14(1), e0211366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211366>
11. Kalia, V. C.; Purohit, H. J. *Crit. Rev. Microbiol.* **2011**, 37(2), 121–140. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532479>
12. Kalia, V. C.; Wood, T. K.; Kumar, P. *Microb. Ecol.* **2014**, 68, 13–23. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0316-y>
13. Zhou, L.; Zhang, Y.; Ge, Y.; Zhu, X.; Pan, J. *Front. Microbiol.* **2020**, 11, 589640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>
14. Fenyvesi, É.; Szente, L. *Encaps.* **2016**, 2, 769–792. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804307-3.00018-1>
15. Szejtli, J. *Pure Appl. Chem.* **2004**, 76(10), 1825–1845. <https://doi.org/10.1351/pac200476101825>
16. Szente, L. *Magy. Kém. Foly.* **2017**, 123(4), 210–216. <https://doi.org/10.24100/MKF.2017.04.210>
17. Szente, L.; Szejtli, J. *Trends Food Sci.* **2004**, 15, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.019>
18. Szente, L. *Magy. Kém. Foly.* **2015**, 121(1), 34–37.
19. Crini, G.; Fourmentin, S.; Fenyvesi, É.; Torri, G.; Fourmentin, M.; Morin-Crini, N. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, 16, 1361–1375. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0763-2>
20. Rezanka, M. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, 17, 49–63. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0779-7>
21. Molnár, M.; Fenyvesi, É.; Berkl, Zs.; Németh, I.; Fekete-Kertész, I.; Márton, R.; Vaszita, E.; Varga, E.; Ujj, D.; Szente, L. *Int. J. Pharm.* **2020**, 594, 120150. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120150>
22. Fekete-Kertész, I.; Berkl, Zs.; Buda, K.; Fenyvesi, É.; Szente, L.; Molnár, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, 108, 271. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13104-7>
23. Ikeda, T.; Inoue, Y.; Suehiro, A.; Ikeshoji, H.; Ishida, T.; Takiguchi, N.; Kuroda, A.; Kato, J.; Ohtake, H. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, 44(1–4), 381–382. <https://doi.org/10.1023/A:1023052810463>
24. Kato, N.; Tanaka, T.; Nakagawa, S.; Morohoshi, T.; Hiratani, H.; Ikeda, T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57(1–4), 419–423. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9228-5>
25. Morohoshi, T.; Tokita, K.; Ito, S.; Saito, Y.; Maeda, S.; Kato, N.; Ikeda, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, 116(2), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.022>
26. Silva, A. R.; Sousa, C.; Exner, D.; Schwaiger, R.; Alves, M. M.; Petrovykh, D. Y.; Pereira, L. *Chemosensors* **2021**, 9, 283. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9100283>
27. Li, Z.; Nair, S. K. *Prot. Sci.* **2012**, 21, 1403–1417. <https://doi.org/10.1002/pro.2132>
28. Miyashiro, T.; Ruby, E. G. *Mol. Microbiol.* **2012**, 84(5), 795–806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x>
29. Grandclément, C.; Tannières, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y.; Faure, D. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, 40, 86–116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>
30. Yates, E. A.; Philipp, B.; Buckley, C.; Atkinson, S.; Chhabra, S. R.; Sockett, R. E.; Goldner, M.; Dessaux, Y.; Cámara, M.; Smith, H.; Williams, P. *Infect. Immun.* **2002**, 70(10), 5635–5646. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5635-5646.2002>
31. Haque, S.; Yadav, D. K.; Bisht, S. C.; Yadav, N.; Singh, V.; Dubey, K. K.; Jawed, A.; Wahid, M.; Dar, A. S. *J. Chemother.* **2019**, 31(4), 161–187. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1599175>

Cyclodextrin modulated quorum quenching –**Investigation of the effect of α -cyclodextrins on bacterial communication in the *Aliivibrio fischeri* model system**

In recent years, the control of bacterial biofilms and bacterial infections has become a challenge in human and veterinary medicine, agriculture, and several fields of industry. This is mainly due to the spread of multidrug-resistant bacterial species, which need to be treated with innovative approaches. This could include cyclodextrin (CD) modulated silencing of the bacterial communication (quorum quenching, QQ), which strategy is based on the molecular encapsulation of the acyl chain of the *N*-acyl-homoserine lactone (AHL) signals produced during the bacterial communication process (quorum sensing, QS). In our study, we aimed at the systematical assessment and comparative evaluation of the time-, concentration- and structure-dependent quorum quenching effect of α -cyclodextrins on Gram-negative, bioluminescent marine bacteria *Aliivibrio fischeri*. The effect of several α -cyclodextrins with different structures and, consequently, different properties on the quorum sensing (bioluminescence) of *A. fischeri* were examined. The effects of cyclodextrins were investigated in microbiological experiments over a wide concentration range at several time points using differentiated methodologies. An analytical method (HPLC-MS/MS analysis) was used to determine the concentration of the most important signals to reveal the molecular processes in the background.

Our results show that certain α -cyclodextrins effectively influence the quorum sensing and the phenotypic traits it controls, presumably due to their quorum quenching effect. This is mainly due to that cyclodextrins form an inclusion complex with AHL signal molecules of *A. fischeri*, thus preventing the formation of specific signal-receptor complexes required for the initiation of the QS pathway. However, the extent of the QQ activity is influenced by, among other factors, the exposure time, the structure and properties of the cyclodextrin molecule, and the cyclodextrin concentration. Furthermore, we have shown that the presence of ACD in the test medium can alter the concentration of different AHL signals.

The overall results of our study suggest that cyclodextrin-modulated quorum quenching is a promising biotechnological strategy that could be the fund of different target-specific cyclodextrin-based traps of the future. The widespread application of these innovative molecular traps could not only reduce bacterial proliferation but also turn the tide in the fight against bacterial biofilms and infections.