

# CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ CHỦNG XẠ KHUẨN *ACTINOPLANES MISSOURIENSIS* VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ PROTEIN CLPC1 CỦA VI KHUẨN LAO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

SECONDARY METABOLITES FROM *ACTINOPLANES MISSOURIENSIS*  
AND INHIBITORY ACTIVITY OF *Mtb* ClpC1 PROTEIN

Huỳnh Thị Ngọc Ni<sup>1,2</sup>, Phạm Thị Ninh<sup>3</sup>, Hồ Ngọc Anh<sup>4</sup>, Jinhua Cheng<sup>5</sup>,  
Joo-Won Suh<sup>5</sup>, Trần Văn Sung<sup>1,3</sup>, Nguyễn Kim Nữ Thảo<sup>6</sup>,  
Lê Thị Hồng Nhung<sup>7</sup>, Nguyễn Quỳnh Uyên<sup>8</sup>,  
Nguyễn Minh Đức<sup>9</sup>, Trần Thị Phương Thảo<sup>1,3,\*</sup>

DOI: <https://doi.org/10.57001/huih5804.2023.180>

## TÓM TẮT

Từ dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*, hai hợp chất flufuran (1) và trehalose (2) đã được phân lập. Cấu trúc của hai hợp chất này được xác định dựa trên việc phân tích dữ liệu phổ NMR, ESI-MS và so sánh với tài liệu tham khảo. Hợp chất 1 được đánh giá khả năng tác động lên hoạt tính thủy phân ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1. Kết quả cho thấy, chất 1 có ảnh hưởng đến quá trình thủy phân của ClpC1, một protein điều hoà quan trọng có chức năng phân hủy các protein lỗi của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*.

**Từ khóa:** *Actinoplanes missouriensis*, flufuran, trehalose, ATPase, ClpC1, *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

From the culture solution of *Actinoplanes missouriensis*, two compounds including flufuran (1) and trehalose (2) were isolated. The structures of these compounds were determined based on the analysis of NMR, ESI-MS spectral data and comparison with references. Compound 1 was evaluated the ATPase hydrolysis activity of the recombinant ClpC1 protein. The results showed that this compound has the ability to affect the hydrolysis of ClpC1, a regulatory protein in Clp protease that plays an important role in degrading misfolded proteins of *Mycobacterium tuberculosis*.

**Keywords:** *Actinoplanes missouriensis*, flufuran, trehalose, ATPase hydrolysis, ClpC1 protein, *Mycobacterium tuberculosis*.

<sup>1</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Phú Yên

<sup>3</sup>Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>5</sup>Trường Đại học Myongji, Hàn Quốc

<sup>6</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>7</sup>Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

<sup>8</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>9</sup>Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

\*Email: [ntuelam2010@gmail.com](mailto:ntuelam2010@gmail.com)

Ngày nhận bài: 03/9/2023

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 03/10/2023

Ngày chấp nhận đăng: 15/10/2023

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao là một bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* gây ra. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), bệnh lao là một trong những nguyên nhân hàng đầu

gây tử vong ở người trên toàn thế giới. Năm 2021, thế giới có khoảng 1,6 triệu ca tử vong và 10,6 triệu ca nhiễm lao mới, trong đó gần 450.000 bệnh lao đa kháng thuốc [1]. Việt Nam là một trong 30 nước có gánh nặng bệnh lao cao nhất trên

thế giới, với khoảng 174.000 ca mắc mới và 11.000 ca tử vong mỗi năm [2]. Đáng báo động hơn, tỷ lệ lao đa kháng thuốc đã tăng lên đáng kể với khoảng 8.400 bệnh nhân lao kháng thuốc, trong đó có một tỉ lệ không nhỏ mắc lao đa kháng thuốc [3]. Bệnh lao đa kháng thuốc được coi xem là mối đe dọa nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng ở các nước [1]. Vì vậy, việc tìm kiếm các hợp chất kháng lao mới để điều trị bệnh là vấn đề rất cần thiết và có tính cấp bách không chỉ ở Việt Nam mà trên toàn thế giới. Xạ khuẩn (Actinomycete) từ lâu đã được biết đến là nguồn vi sinh vật cung cấp các hợp chất kháng sinh đã được sử dụng làm thuốc [4].

Đối với nhiều vi sinh vật gây bệnh nói chung và vi khuẩn lao nói riêng, protein ClpC1 đóng vai trò quan trọng trong quá trình sống của chúng. Khác với nhiều loài vi khuẩn khác, ClpC1 ở *M. tuberculosis* có trình tự bảo toàn cao và khi kết hợp với phức hợp ClpP sẽ đảm nhận vai trò chaperone trong tế bào [5]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy khi ClpC1 mất hoạt tính, sự phân hủy protein trong tế bào bị giảm hoặc có thể bị dừng lại hoàn toàn [6, 7]. Do đó, protein ClpC1 đã trở thành mục tiêu quan trọng trong quá trình tìm kiếm và sàng lọc các tác nhân chống lại vi khuẩn lao một cách an toàn và hiệu quả. Protein ClpC1 được tái tổ hợp từ vi khuẩn *Escherichia coli* tại các phòng thí nghiệm mà không cần mức độ an toàn sinh học cao [8]. Nhiều hợp chất phân lập từ xạ khuẩn đã được phát hiện và thể hiện hoạt tính tiềm năng tác động lên quá trình thủy phân protein của ClpC1 như ecumicin, cyclomarin A, và lassomycin... [9 - 11].

Xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis* lần đầu được phân lập từ môi trường đất ở Hamilton, bang Missouri, Hoa Kỳ và được Couch mô tả đầu tiên năm 1963 [12]. Tuy nhiên, qua nghiên cứu tài liệu cho thấy, cho đến nay trên thế giới có rất ít tài liệu liên quan đến các hợp chất thứ cấp được sản xuất từ loài này. Xạ khuẩn này sản sinh ra enzym 6-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl- $\beta$ -D-glucosidase làm xúc tác cho quá trình thủy phân các flavonoid 7-O-rutinosylate và các dẫn xuất của rutinose [13]. Ngoài ra, từ chủng xạ khuẩn này đã phân lập được actaplanin (A4696) - một phức hợp kháng sinh glycopeptide có hoạt tính ức chế mạnh đối với vi khuẩn gram (+) [14, 15]. Ở Việt Nam chưa có nhóm nghiên cứu nào công bố về các hợp chất thứ cấp và hoạt tính sinh học của chủng xạ khuẩn *A. missouriensis*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nuôi cấy, nhân giống và phân lập các hợp chất thứ cấp từ chủng xạ khuẩn *A. missouriensis*. Hai hợp chất là flufuran (1) và trehalose (2) đã được phân lập và xác định cấu trúc. Hợp chất 1 được đánh giá khả năng tác động lên hoạt động thủy phân ATP (ATPase) của protein ClpC1, một protein tái tổ hợp từ vi khuẩn *Escherichia coli* được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Đối tượng

Chủng xạ khuẩn hiếm *A. missouriensis* VTCC40900 được nuôi cấy và được cung cấp bởi Trung tâm nguồn gen Vi sinh vật quốc gia - Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phổ NMR được đo trên thiết bị Bruker AM500 FT-NMR, tại tần số 125MHz đối với  $^{13}\text{C}$  NMR và 500MHz đối với  $^1\text{H}$  NMR.

Silica gel 40 - 63 $\mu\text{m}$  và Sephadex LH-20 được sử dụng trong sắc ký cột (CC). Sắc ký lớp mỏng TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (0,25mm, Merck).

Protein ClpC1 của vi khuẩn lao *M. tuberculosis* được tái tổ hợp từ chủng vi khuẩn *Escherichia coli* Rosetta 2 và tinh sạch qua cột chứa ion Ni<sup>2+</sup> với đuôi His-tag (Ni-TED hãng Macherey-Nagel). Hoạt tính thủy phân ATP của protein ClpC1 tái tổ hợp được xác định bằng cách đánh giá lượng phosphat giải phóng ra sau phản ứng bằng thuốc thử BIOMOL<sup>®</sup> Green (hãng Enzo Life Sciences).

### 2.3. Thực nghiệm

#### 2.3.1. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ *Actinoplanes missouriensis*

Chủng xạ khuẩn *A. missouriensis* được nuôi cấy trên môi trường thạch trong 5 - 7 ngày, sau đó được cấy vào bình nón 1000mL chứa 350mL môi trường YS, lắc với tốc độ 160 vòng/phút, 28 - 30°C, trong 72 giờ. Dịch xạ khuẩn không tạp nhiễm, có mật độ 25.10<sup>6</sup> - 30.10<sup>6</sup> tế bào/mL được làm giống gốc cho hệ thống lên men 50 lít. Sau quá trình lên men 6 ngày, dịch nuôi cấy (50L) được tiến hành ly tâm để tách riêng dịch nước và cặn tế bào. Phần dịch nước (40L) được chiết với EtOAc (3 x 4h x 20L), cất loại dung môi thu được cặn chiết EtOAc ký hiệu là H9 (7,3g). Cặn chiết EtOAc được tiến hành chạy sắc ký cột Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải là methanol/nước (9:1) thu được 10 phân đoạn (H9.1 → H9.10). Phân đoạn H9.2 (1,5g) được chạy sắc ký cột silicagel (EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O, 6:4:0,1) thu được 9 phân đoạn (H9.2.1 → H9.2.9). Phân đoạn H9.2.2 (35mg) được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế thu được hợp chất 1 (4mg). Phân đoạn H9.2.9 (140mg) được tinh chế bằng cột Sephadex LH-20 (MeOH:H<sub>2</sub>O, 9:1) và lặp lại hai lần thu được hợp chất 2 (3,6mg).

**Flufuran (1):** Tinh thể hình kim; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, ESI-MS:  $m/z = 140,7$  [M-H]<sup>-</sup>.  $^1\text{H-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)  $\delta_{\text{H}}$  7,95 (1H, s, H-2), 6,51 (1H, s, H-4), 4,42 (2H, s, H-7);  $^{13}\text{C-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz)  $\delta_{\text{C}}$  177,2 (C-6), 170,2 (C-5), 147,4 (C-3), 141,0 (C-2), 110,6 (C-4), 61,2 (C-7).

**Trehalose (2):** Chất rắn màu trắng; C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, ESI-MS:  $m/z = 364,9$  [M+Na]<sup>+</sup>.  $^1\text{H-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz)  $\delta_{\text{H}}$  5,14 (2H, d,  $J = 3,5\text{Hz}$ ), 3,84 (6H, m), 3,70 (2H, m), 3,49 (2H, dd,  $J = 10,0, 3,5\text{Hz}$ ), 3,33 (2H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz)  $\delta_{\text{C}}$  95,0 (C-1), 74,6 (C-3), 73,8 (C-2), 73,2 (C-5), 71,9 (C-4), 62,6 (C-6).

#### 2.3.2. Đánh giá hoạt tính ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1

*Biến nạp, biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp ClpC1*

Protein tái tổ hợp ClpC1 được tổng hợp bằng việc gắn đoạn gen đặc trưng cho ClpC1 của vi khuẩn *M. tuberculosis* với pET28a (+) plasmid, biến nạp và biểu hiện trên *E. coli* Rosetta2 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Môi trường LB (Luria-Bertani) Broth High Salt (MB cell, Korea) (Tryptonee

10g; Yeast Extract 55g; Sodium Chloride 10g; pH = 7,0 ± 0,2, 25°C) được dùng làm môi trường nuôi cấy có chứa 500µg/mL Kanamycin (Sigma, USA). Xác định nồng độ vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy sau tăng sinh tại nồng độ OD<sub>600nm</sub> đạt ngưỡng 0,6 - 0,8, bổ sung 1mM IPTG (isopropyl01-thio-β-D galactopyranoside-Sigma) để tăng cường độ biểu hiện protein trong 16 h và tiếp tục nuôi tại 16°C [16, 17].

Ly tâm thu hồi cặn tế bào sau nuôi cấy và tiến hành phá màng tế bào bằng phương pháp sóng siêu âm trên hệ thống siêu âm. Protein tái tổ hợp ClpC1 được tinh sạch bằng cột tinh sạch Ni<sup>2+</sup> ion. Điện di SDS-PAGE với nồng độ gel 12% (Bio-rad, USA) được sử dụng để phân tích chất lượng protein sau tinh sạch [18].

Nồng độ protein sau tinh sạch được đo bằng phương pháp Bradford tại bước sóng 595nm trên hệ thống máy Infinite<sup>®</sup> 200 PRO (Tecan, Thụy Sĩ) [19, 20]. Dung dịch đệm chứa 50mM Tris-HCl, 100mM KCl, 80mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5 và cột khử muối PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Thụy Điển) được sử dụng trong quá trình thay đổi thành phần của dung dịch đệm cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm đánh giá hoạt độ thủy phân ATP của protein.

*Đánh giá hoạt độ ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1*

Hoạt tính ATPase được phát hiện bằng cách ủ protein tái tổ hợp ClpC1 với nồng độ ATP tương ứng ở nhiệt độ 37°C trong 1 h trong dung dịch đệm phản ứng phù hợp, thể tích cuối cùng là 50µL. Hoạt tính xác định ATPase của ClpC1 được đo bằng cách đánh giá lượng phosphat được giải phóng ra bằng thuốc thử BIOMOL<sup>®</sup> Green ở bước sóng hấp thụ 620nm trên hệ máy Infinite<sup>®</sup> 200 PRO (Tecan, Thụy Sĩ) [21]. Lượng photphat được giải phóng sau phản ứng được xử lý và phân tích trên phần mềm OriginPro8. Dựa vào các kết quả đã được công bố, ecumicin và rufomycin được sử dụng làm chất đối chứng dương trong thí nghiệm này.

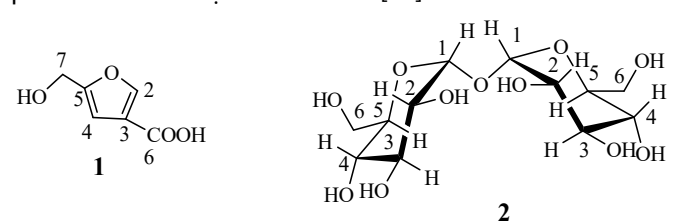
**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Cấu trúc của các hợp chất phân lập từ chủng xạ khuẩn hiếm *Actinoplanes missouriensis***

Phổ khối ESI-MS của hợp chất **1** cho pic ion phân tử tại m/z 140,7 [M-H]. Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR xuất hiện hai tín hiệu tại δ<sub>H</sub> 7,95 (1H, s), 6,51 (1H, s) và 1 nhóm methylen gắn oxi tại δ<sub>H</sub> 4,42 (2H, s). Phổ <sup>13</sup>C-NMR xuất hiện tín hiệu của một nhóm carbonyl tại δ<sub>C</sub> 177,2; tín hiệu của 4 carbon vòng thơm tại δ<sub>C</sub> 170,2 (C-5), 147,4 (C-3), 141,0 (C-2) và 110,6 (C-4); và 1 carbon methylen tại δ<sub>C</sub> 61,2. So sánh với tài liệu tham khảo, cho phép kết luận chất **1** là dẫn xuất của vòng furan [22]. Phổ NMR của chất **1** hoàn toàn trùng khớp với 5-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid hay flufuran. Flufuran (**1**) được phân lập lần đầu tiên từ chủng nấm *Polyporus arcularius* [22]. Flufuran thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với chủng *Phytophthora cinnamomi* và *P. nicotianae*. Hợp chất này còn thể hiện hoạt tính ức chế enzyme monoamine oxidase (MAO), một enzym có liên quan đến các bệnh về thần kinh như trầm cảm, parkison [23, 24].

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn, màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất này cho pic ion phân tử tại m/z

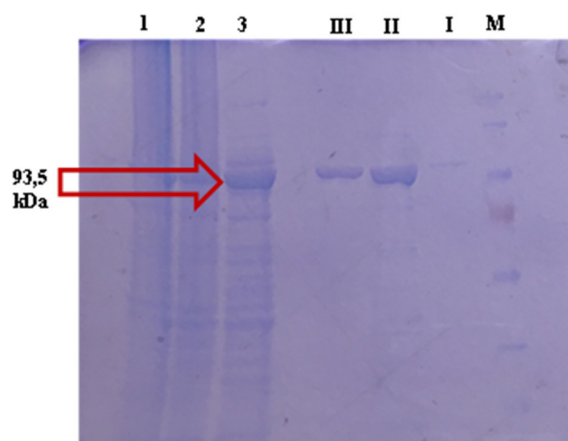
364,9 [M+Na]<sup>+</sup>. Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR của chất **2** cho thấy tín hiệu proton anomer tại δ<sub>H</sub> 5,14 (d, J = 3,5Hz) với hằng số tương tác nhỏ (3,5Hz), cho thấy đây là một đường α-glucoside. Ngoài ra, các tín hiệu proton của đường glucose được quan sát thấy tại δ<sub>H</sub> 3,84 (m), 3,70 (m), 3,49 (dd, J = 10,0, 3,5Hz), 3,33 (m). Phổ <sup>13</sup>C-NMR xuất hiện các tín hiệu carbon tại δ<sub>C</sub> 95,0 (C-1); 74,6 (C-3); 73,8 (C-2); 73,2 (C-5); 71,9 (C-4); 62,6 (C-6). Kết hợp các dữ liệu phổ NMR, phổ MS (m/z 364,9 [M+Na]<sup>+</sup>) và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận chất **2** là trehalose [25]. Trehalose là một disaccharide bao gồm hai phân tử đường α-glucoside qua liên kết α,α-1,1-glycoside [25]. Trehalose được sinh ra trong quá trình sinh tổng hợp của *M. smegmatis* và *M. tuberculosis*. Trehalose rất cần thiết cho sự phát triển và tồn tại của vi khuẩn [25].



Hình 1. Cấu trúc của hợp chất **1** và **2** từ chủng xạ khuẩn *A. missouriensis*

**3.2. Hoạt tính ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1**

Việc tinh sạch protein tái tổ hợp bằng cột tinh sạch Ni-TED được thực hiện nhanh chóng, dễ dàng và phù hợp với các thí nghiệm tổng hợp protein trong quy mô phòng thí nghiệm [26]. Kết quả thí nghiệm cho thấy các protein ClpC1 sau khi được tổng hợp đều nằm trong màng tế bào, chỉ được thu lại sau quá trình phá màng tế bào bằng sóng siêu âm. Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu từ trước đến nay đã chỉ ra ClpC1 là một dạng protein nội bào đảm nhiệm chức năng quan trọng trong việc kiểm duyệt và loại bỏ các protein hoặc phân tử không còn cần thiết, giúp duy trì sự ổn định và hoạt động hiệu quả của các protein khác trong tế bào vi khuẩn. Protein tái tổ hợp ClpC1 có trọng lượng phân tử xấp xỉ 93,5kDa (hình 2).



Hình 2. Quá trình điện di với cột tinh sạch Ni-TED để tinh sạch protein tái tổ hợp ClpC1

M: Maker; 1: dịch nuôi cấy; 2, 3: dịch từ cặn tế bào sau khi phá tế bào; I, II, III: Phân đoạn thu dịch

Hoạt tính thủy phân ATP và mức độ ổn định của protein tái tổ hợp ClpC1 được tiến hành kiểm tra và theo dõi trong suốt thí nghiệm.

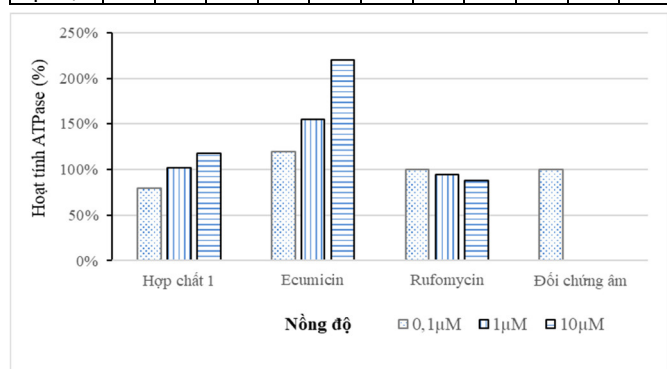
Phương pháp đo lượng phosphate (Pi) giải phóng ra, được chúng tôi sử dụng để đo hoạt độ thủy phân ATP của tế bào. Khi enzyme ATPase thủy phân ATP (Adenosin Triphosphat) thành ADP (Adenosin Diphosphat) và Pi thì Pi sẽ được giải phóng. Lượng Pi này có thể được đo bằng cách sử dụng phản ứng hoá học với chất chỉ thị BIOMOL® Green [27]. Đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và chi phí thấp cho phép xác định hàm lượng nhỏ Pi. Kết quả cho thấy, tại nồng độ 10µM, ATP bắt đầu tăng dần hoạt độ thủy phân và thể hiện đầy đủ chức năng thủy phân (bảng 1). Quan sát kết quả ở bảng 2, hoạt động phân giải ATP ổn định trong 7 ngày (chỉ dao động trong khoảng 1,685 - 1,829nmol/µg/phút). Sau ngày thứ 7, hoạt độ ATPase không còn ổn định.

Bảng 1. Hoạt độ sử dụng ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1 theo nồng độ ATP

Nồng độ	5µM	10µM	50µM	100µM	200µM	250µM	500µM
Hoạt độ phân hủy ATP (nmol/µg/phút)	0,2	0,5	1,1	2,1	4,3	8,6	16,7

Bảng 2. Hoạt độ sử dụng ATPase của protein tái tổ hợp ClpC1 theo ngày

Ngày	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hiệu suất hoạt động phân giải ATP (nmol/µg/phút)	1,775	1,685	1,740	1,829	1,824	1,871	1,754	1,711	4,527	1,089	4,049



Hình 3. Kết quả đánh giá tác động của hợp chất 1 lên ATPase của ClpC1

Các tài liệu công bố đã cho thấy ecumicin và rufomycin là hai loại kháng sinh có đích tác động trực tiếp đến protein ClpC1 của vi khuẩn *M. tuberculosis* bằng cách ảnh hưởng đến chức năng thủy phân ATP của nó [16, 18, 28]. Do đó, ecumicin và rufomycin được sử dụng làm chất đối chứng dương trong nghiên cứu này. Chúng tôi đã thử nghiệm các nồng độ khác nhau của hợp chất 1 và quan sát hoạt động ATPase của protein ClpC1. Kết quả trên biểu đồ (hình 3) cho thấy hoạt động ATPase tăng dần theo nồng độ của hợp chất 1 (0,1µM, 1,0µM và 10,0µM). Do vậy, hợp chất 1 có khả năng

ảnh hưởng đến quá trình thủy phân ATP của protein ClpC1 tương tự như ecumicin, tuy nhiên với hoạt độ phân giải ATP thấp hơn. Các kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy đích tác động trực tiếp tới protein ClpC1 của vi khuẩn lao của hợp chất 1. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế và vị trí tác động của hợp chất 1 lên protein ClpC1 của vi khuẩn lao.

#### 4. KẾT LUẬN

Đây là lần đầu tiên hai hợp chất flufuran (1) và trehalose (2) được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Actinoplanes missouriensis*. Kết quả nghiên cứu cho thấy hợp chất 1 có tác động đến quá trình thủy phân ATPase của protein ClpC1 với khả năng làm tăng dần hoạt độ ATPase. Đây cũng là lần đầu tiên hợp chất flufuran được đánh giá khả năng tác động lên quá trình thủy phân ATPase của ClpC1, một protein điều hòa quan trọng của vi khuẩn lao *M. tuberculosis*. Nghiên cứu của chúng tôi góp phần gợi mở tiềm năng ứng dụng của hợp chất flufuran được phân lập từ chủng xạ khuẩn *A. missouriensis* trong quá trình tìm kiếm các hợp chất kháng lao phục vụ trong y dược.

#### LỜI CẢM ƠN

Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ (Đề tài nghị định thư Việt Nam - Hàn Quốc, mã số NĐT.47.KR/18).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Villar-Hernández R., Ghodousi A., Konstantynovska O., Duarte R., Lange C., Raviglione M., 2023. *Tuberculosis: current challenges and beyond*. *Breathe*, 19. <https://doi.org/10.1183/20734735.0166-2022>.
- [2]. Ngo D. M., Doan N. B., Tran S. N., Hoang L. B., Nguyen H. B., Nguyen V. D., 2023. *Practice regarding tuberculosis care among physicians at private facilities: A cross-sectional study from Vietnam*. *Plos one*, 18, e0284603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284603>.
- [3]. Nguyen T. M. P., Le T. H. M., Merle C. S. C., Pedrazzoli D., Nguyen N. L., Decroo T., Nguyen B. H., Hoang T. T. T., Nguyen V. N., 2023. *Effectiveness and safety of bedaquiline-based, modified all-oral 9-11-month treatment regimen for rifampicin-resistant tuberculosis in Vietnam*. *International Journal of Infectious Diseases*, 126, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.11.007>.
- [4]. Zhu Y., Zheng G., Xin X., Ma J., Ju J., An F., 2022. *Combinatorial strategies for production improvement of anti-tuberculosis antibiotics ilamycins E*. *Bioresources and Bioprocessing*. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00599-z>.
- [5]. Taylor G., Frommherz Y., Katikaridis P., Layer D., Sinning I., Carroni M., Weber-Ban E., Mogk A., 2022. *Antibacterial peptide Cyclomarina creates toxicity by deregulating the Mycobacterium tuberculosis ClpC1-ClpP1P2 protease*. *Journal of Biological Chemistry*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102202>.
- [6]. Kazmaier U., Junk L., 2021. *Recent developments on the synthesis and bioactivity of ilamycins/rufomycins and cyclomarins, marine cyclopeptides that demonstrate anti-malaria and anti-tuberculosis activity*. *Marine Drugs*, 19, 446. <https://doi.org/10.3390/md19080446>.
- [7]. Kumar G., 2023. *Natural products and their analogues acting against Mycobacterium tuberculosis: A recent update*. *Drug Development Research*. <https://doi.org/10.1002/ddr.22063>.

- [8]. Bhanot A., Lunge A., Kumar N., Kidwai S., Singh R., Sundriyal S., Agarwal N., 2023. *Discovery of small molecule inhibitors of Mycobacterium tuberculosis ClpC1: SAR studies and antimycobacterial evaluation*. Results in Chemistry, 5, 100904. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100904>.
- [9]. Taylor G., Cui H., Leodolter J., Giese C., Weber-Ban E., 2023. *ClpC2 protects mycobacteria against a natural antibiotic targeting ClpC1-dependent protein degradation*. Communications Biology, 6, 301. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04658-9>.
- [10]. Bordes P., Genevaux P., 2021. *Control of toxin-antitoxin systems by proteases in Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in Molecular Biosciences, 8, 691399. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.691399>.
- [11]. Jagdev M. K., Tompa D. R., Ling L. L., Peoples A. J., Dandapat J., Mohapatra C., Lewis K., Vasudevan D., 2023. *Crystal structure of the N-terminal domain of MtClpC1 in complex with the anti-mycobacterial natural peptide Lassomycin*. International Journal of Biological Macromolecules, 253, 126771. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126771>.
- [12]. Couch J. N., 1963. *Some new genera and species of the Actinoplanaceae*. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society, 79(1), 53-70.
- [13]. Neher B. D., Mazzaferro L. S., Kotik M., Oyhenart J., Halada P., Křen V., Breccia J. D., 2016. *Bacteria as source of diglycosidase activity: Actinoplanes missouriensis produces 6-O-a-l-rhamnosyl-β-d-glucosidase active on flavonoids*. Applied microbiology biotechnology, 100, 3061-3070. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7088-x>.
- [14]. Hunt A. H., Debono M., Merkel K. E., Barnhart M., 1984. *Structure of the pseudoaglycon of actaplanin*. The Journal of Organic Chemistry, 49, 635-640. <https://doi.org/10.1021/jo00178a011>.
- [15]. Debono M., Merkel K. E., Molloy R. M., Barnhart M., Presti E., Hunt A. H., Hamill R. L., 1984. *Actaplanin, new glycopeptide antibiotics produced by Actinoplanes missouriensis the isolation and preliminary chemical characterization of actaplanin*. The Journal of Antibiotics, 37, 85-95. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.85>.
- [16]. Jung I.P., Ha N.R., Kim A. R., Kim S.H., Yoon M.Y., 2017. *Mutation analysis of the interactions between Mycobacterium tuberculosis caseinolytic protease C1 (ClpC1) and ecumicin*. International Journal of Biological Macromolecules, 101, 348-357. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.126>.
- [17]. Jagdev M. K., Dandapat J., Vasudevan D., 2021. *Recombinant expression, purification and SAXS analysis of Arabidopsis thaliana ClpC1*. International Journal of Biological Macromolecules, 167, 1273-1280. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.081>.
- [18]. Duc N. M., Lee H., Suh J. W., Thuy V. T. B., Minh N. N., Hong N. P. L., 2020. *The high-throughput screening system for inhibitor Mycobacterium tuberculosis compounds based on ATP hydrolysis activity of recombinant protein ClpC1*. Vietnam Journal of Biotechnology, 18, 239-247.
- [19]. Bradford M. M., 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [20]. Kar N. P., Sikriwal D., Rath P., Choudhary R. K., Batra J. K., 2008. *Mycobacterium tuberculosis ClpC1: Characterization and role of the N-terminal domain in its function*. The FEBS Journal, 275, 6149-6158. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06738.x>.
- [21]. Li L., MacIntyre L. W., Ali T., Russo R., Koirala B., Hernandez Y., Brady S. F., 2021. *Biosynthetic interrogation of soil metagenomes reveals metamarin, an uncommon cyclomarin congener with activity against Mycobacterium tuberculosis*. Journal of natural products, 84, 1056-1066. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01104>.
- [22]. Cabrera G. M., Julia Roberti M., Wright J. E., Seldes A. M., 2002. *Cryptoporin and isocryptoporin acids from the fungal cultures of Polyporus arcularius and P. ciliatus*. Phytochemistry, 61, 189-193. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00221-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00221-2).
- [23]. Evidente A., Cristinzio G., Punzo B., Andolfi A., Testa A., Melck D., 2009. *Flufuran, an antifungal 3, 5-disubstituted furan produced by Aspergillus flavus Link*. Chemistry Biodiversity, 6, 328-334. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800292>.
- [24]. Elsunni M. A., Yang Z.D., 2018. *Secondary metabolites of the endophytic fungi Penicillium polonicum and their monoamine oxidase inhibitory activity*. Chemistry of Natural Compounds, 54, 1018-1019. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2540-7>.
- [25]. Shleeva M. O., Trutneva K. A., Demina G. R., Zinin A. I., Sorokoumova G. M., Laptinskaya P. K., Shumkova E. S., Kaprelyants A. S., 2017. *Free trehalose accumulation in dormant Mycobacterium smegmatis cells and its breakdown in early resuscitation phase*. Frontiers in Microbiology, 8, 524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00524>.
- [26]. Kielkopf C. L., Bauer W., Urbatsch I. L., 2020. *Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography*. Cold Spring Harbor Protocols, 102194-102194. Purification of polyhistidine-tagged proteins.
- [27]. Baker T. A., Sauer R. T., 2012. *ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine*. Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research, 1823, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.007>.
- [28]. Choules M. P., Wolf N. M., Lee H., Anderson J. R., Grzelak E. M., Wang Y., Ma R., Gao W., McAlpine J. B., Jin Y. Y., Cheng J., Lee H., Suh J. W., Duc N. M., Paik S., Choe J. H., Jo E. K., Chang C. L., Lee J. S., Jaki B. U., Pauli G. F., Franzblau S. G., Cho S., 2019. *Rufomycin Targets ClpC1 Proteolysis in Mycobacterium tuberculosis and M. abscessus*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 63. <https://doi.org/10.1128/aac.02204-18>.

---

#### AUTHORS INFORMATION

**Huynh Thi Ngoc Ni<sup>1,2</sup>, Pham Thi Ninh<sup>3</sup>, Ho Ngoc Anh<sup>4</sup>, Jinhua Cheng<sup>5</sup>, Joo-Won Suh<sup>5</sup>, Tran Van Sung<sup>1,3</sup>, Nguyen Kim Nu Thao<sup>6</sup>, Le Thi Hong Nhung<sup>7</sup>, Nguyen Quỳnh Uyen<sup>8</sup>, Nguyen Minh Duc<sup>9</sup>, Tran Thi Phuong Thao<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Graduate University of Sciences and Technology, VAST, Vietnam

<sup>2</sup>Phu Yen University, Vietnam

<sup>3</sup>Institute of Chemistry, VAST, Vietnam

<sup>4</sup>Institute of Biotechnology, VAST, Vietnam

<sup>5</sup>Myongji University, Yongin, Korea

<sup>6</sup>Hanoi University of Sciences - VNU, Vietnam

<sup>7</sup>Hanoi University of Industry, Vietnam

<sup>8</sup>Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

<sup>9</sup>Institute of Genome Research, VAST, Vietnam