

НА ПЕРЕСЕЧЕНИИ БИОЭНЕРГЕТИКИ И ОТКРЫТИЯ АНТИБИОТИКОВ*

Обзор

© 2020 К. Льюис

*Antimicrobial Discovery Center, Department of Biology, Northeastern University,
Boston, MA, USA; E-mail: k.lewis@neu.edu*

Поступила в редакцию 10.07.2020

После доработки 19.08.2020

Принята к публикации 19.08.2020

Академик Владимир Скулачев был моим наставником, его пионерские работы в области биоэнергетики вдохновили на открытия, описанные в настоящей работе. Исследование основных механизмов хемииосмотического сопряжения неожиданно привело нас к трансмембранным насосам с множественной устойчивостью к лекарствам, которые сильно ограничивают разработку новых антибиотиков. Одним из основных преимуществ Скулачева и его группы было открытие мембранного потенциала митохондрий с использованием проникающих катионов, таких как TRP⁺, который служил в качестве электрического зонда. Нами обнаружено существование их природных аналогов у растений, в которых они действуют против микробов. Наиболее сложные проблемы при открытии антимикробных лекарств заключаются в устойчивости к действию антибиотиков хронических инфекций, ассоциированных со спящими персистирующими клетками, устойчивости к антибиотикам и возникшим в связи с этим кризисом антимикробной резистентности, и поиске новых химических соединений, действующих против грамотрицательных бактерий, защищаемых их мощными насосами множественной устойчивости к лекарствам (MDR pumps). Наши исследования персистирующих клеток показали, что они представляют собой редкие клетки, которые образуются в результате стохастических колебаний экспрессии ферментов цикла Кребса, приводящих к падению уровня АТФ, отключению мишеней устойчивости к антибиотикам. При поиске соединений, которые могут повреждать мишени в отсутствие АТФ, был идентифицирован ацилдепсипептид (ADEP), который способен активировать протеазу ClpP, подталкивающую клетки к самоперевариванию. Выращивание ранее некультивируемых бактерий привело к открытию теиксобактина, нового антибиотика, способного воздействовать на клеточную стенку. Теиксобактин не удаляется из клетки за счет его взаимодействия с липидом II и липидом III, предшественниками пептидогликана и тейхоевой кислоты клеточной стенки, локализованными на её поверхности. При этом не происходит изменения мишеней, и теиксобактин является антибиотиком, к которому не возникает резистентность. Поиск соединений, действующих против грамотрицательных бактерий, привело к обнаружению даробактинов, которые также поражают мишень, находящуюся на поверхности клеток, а именно эссенциальный шаперон BamA.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоэнергетика, персистирующие клетки, антибиотики, ацилдепсипептид, теиксобактин, даробактин.

DOI: 10.31857/S0320972520120015

Посвящается Владимиру Скулачеву, моему другу и учителю.

ВВЕДЕНИЕ

Мне посчастливилось постигать основы науки в лаборатории Скулачева. Когда я был студентом, я был очарован основной загадкой, над раскрытием которой работали Скулачев и его группа, а именно, механизмом, лежащим в основе окислительного фосфорилирования. В то время был хорошо известен механизм синтеза АТФ в процессе гликолиза («субстратное фос-

форилирование»), суть которого заключалась в том, что расщепление глюкозы приводит к образованию высокоэнергетических промежуточных соединений, таких как, например, фосфоенопируват, фосфатная группа которого переносится на молекулу АДФ с образованием АТФ.

Эта химия элегантна, но не вызывает удивления. Предполагалось, что окислительное фосфорилирование работает точно также: окисление пирувата в цикле Кребса приводит к подаче водорода в электрон-транспортную цепь митохондрий. Окисление способствует образованию высокоэнергетических интермедиатов, таких как НАДН-дегидрогеназа~Pi. Однако попытки

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 12, 2020.

выделить такие интермедиаты оказались неудачными. Более того, при этом было возможно измерять увеличение уровня АТФ в ответ на окисление субстрата в изолированных митохондриях или даже в субмитохондриальных мембранных частицах, но это не наблюдалось в случае выделенных белковых комплексов. В тот момент, когда мембрана исчезала, происходило окислительное фосфорилирование. Эта загадка побудила Mitchell P. предложить радикальную теорию: митохондрии являются батареями, и их мембрана заряжается в результате функционирования электрон-транспортной цепи, которая перекачивает протоны через неё. Затем протоны текут обратно через АТФ-синтазу, разряжая батарею, и образуется АТФ [1–3]. Основной идеей этой гипотезы было то, что митохондриальная мембрана заряжена, но это оказалось невозможно измерить, так как органелла меньше микроэлектрода. Важный прорыв произошел благодаря тому, что известно сейчас как «катионы Скулачева» – соединения, такие как тетрафенилфосфоний, которые могут проникать внутрь митохондрий и действовать как электрические зонды. Если при этом мембрана заряжена, то они будут накапливаться. Определяя изменения концентрации этих катионов вне митохондрий, Скулачев и его команда смогли определить мембранный потенциал и рассчитать его с использованием уравнения Нернста [4]. Это важное открытие послужило доказательством хемиосмотической теории. Другое важное наблюдение, которое было опубликовано в журнале «Nature», привело к описанию действия разобщителей окислительного фосфорилирования [5]. Эти вещества, принадлежащие к различным классам химических соединений, разобщают процесс дыхания и синтез АТФ. Скулачев и его команда обнаружили, что способность соединений, таких как СССР (протонофор), вызывать разобщение коррелирует с их активностью в качестве протонофоров, переносящих протоны через мембрану, вызывающих разрушение протон-движущей силы. Этот результат также свидетельствовал в пользу хемиосмотической теории. К тому времени, когда я стал работать в группе Скулачева, эти открытия были уже опубликованы, но дух решения серьезных вопросов и поиска решений, казалось бы, неразрешимых проблем был еще очень жив.

ОТ ЛОКАЛЬНОГО СОПРЯЖЕНИЯ ДО MDR-НАСОСОВ

В 1987 г. я со своей семьей переехал в США и в течение короткого периода работал в качестве

пост-дока в лаборатории Адлера, который открыл основной механизм хемотаксиса бактерий. Терпеливо выслушав мои различные идеи, Джулиус сказал мне следующее: «...вам нужен обобщенный подход, чтобы открывать новые молекулы». Это означало, что конкретные гипотезы не приведут к новому химическому веществу. Вооружившись этой мудростью, спустя несколько месяцев я получил свою первую должность на факультете в ранге ассистента профессора на кафедре прикладной биологии в MIT. Однако через 3 дня после моего поступления на работу, кафедра была расформирована, и меня, как и других сотрудников, имеющих право на работу, перевели на кафедру биологии, где я в течение двух лет отработал свой контракт. Те события мало повлияли на меня, поскольку я имел собственную лабораторию, стартовое финансирование и свободу выбора, что делать. Но возникла одна проблема.

Биоэнергетика становилась зрелой наукой и двигалась к исследованиям структуры белков. Хотя я с удовольствием читал статьи, посвященные структуре и функциям белков, мои интересы лежали в области ранних открытий. Думая о том, чтобы начать что-то новое, я задумался о затяжных спорах в области биоэнергетики: делокализованное сопряжение против локального. В то время как Mitchell предположил, что протоны проходят через мембрану, Williams высказал мнение, что они также могут перемещаться латерально непосредственно от компонента дыхательной цепи на АТФ-синтазу [6]. В поддержку этого предположения в то время было небольшое количество неубедительной литературы. Обсуждая проблему, Скулачев классно поставил вопрос: «...вы строите мост через реку или вдоль неё?». Локальное сопряжение будет иметь одно преимущество: оно будет работать в органеллах или клетках с поврежденной мембраной и будет выступать как инструмент обеспечения безопасности. Если бы существовало локальное сопряжение, то я решил, что место, где нужно искать её, есть у бактерий с их непревзойденной способностью адаптироваться к изменяющимся внешним условиям. Я придумал простой эксперимент: добавляю к клеткам СССР и наблюдаю их адаптивный ответ. Добавление незначительных количеств СССР к клеткам *E. coli*, естественно, не оказывало на них влияния. Затем ступенчатое повышение количества ингибитора привело к образованию клеток, которые продолжали расти после того, как была превышена предполагаемая необходимая для ингибирования концентрация этого разобщителя. Поскольку клетки приспосабливались к синтетическому соединению, с которым они никогда не встречались в природе, мы подумали, что они должны быть распознают

не сам СССР, а последствия его действия, такие как уменьшение протон-движущей силы (pmf) и переключение на какой-то защитный механизм, такой как локальное сопряжение. Отбор клеток с геномной библиотекой, клонированных с помощью вектора экспрессии для обеспечения выживания в присутствии СССР, тогда приведет нас к этому механизму. Я сказал своему талантливому пост-доку Ольге Ломовской (в настоящее время приглашенный профессор биологии в Qrex), чтобы мы ни нашли, это должно быть интересно, но это не будет транспортер СССР. Действительно, попытки выдавить СССР через мембрану были бы бесполезны, это только ускорило бы перенос протонов (рис. 1). Ольга отобрала клетки с повышенной устойчивостью к действию СССР, секвенировала плазмидную вставку и обнаружила, что он кодирует транспортер из семейства Major Facilitator [7].

Это было напоминание о том, что делать точные прогнозы в биологии очень проблематично. В опероне был другой ген, который обладал гомологией с «белком слияния мембран» и входил в состав транспортера гемолизина через мембрану из *E. coli*. Это дало ключ к разгадке, и было предположено, что EmrAB (так он был назван) является бактериальным насосом множественной лекарственной устойчивости и антипортером протонов, выкачивая вещества на всем протяжении внешней мембраны клетки, которая служит в качестве барьера для гидрофобных молекул (рис. 1). Другой неожиданной находкой был механизм, который активировал насос в ответ на СССР. Это оказался репрессор EmrAB, действующий как связывающийся с СССР сенсор множественной лекарственной устойчивости [8].

Эта линия экспериментов подсказала мне, что локальное сопряжение не существует, однако в ходе процесса мы нашли что-то довольно интересное. Koran G. (сейчас мой коллега по MIT) представил нашу статью, касающуюся EmrAB, в журнал «PNAS». Сделано предположение, что бактерии защищают себя от токсичных соединений комбинированно за счет барьера в виде внешней мембраны и MDR-насосов, которые через неё удаляют токсины. EmrAB оказался первым примером трансмембранного MDR, но у него был довольно ограниченный репертуар. Вслед за нашей статьей Nikaido опубликовал результаты изучения другого трансмембранного насоса, AcrAB [9]. Этот насос обладает широким спектром действия и играет важную роль в выкачке антибиотиков. MDR-насосы подвигли нас на путь разработки лекарств.

Существуют ли предпочитаемые MDR-насосами субстраты, которые могли бы указать на

их природную функцию? В целом, у бактерий, особенно у грамположительных видов, у которых отсутствует внешний барьер в виде мембраны, наилучшими субстратами являются гидрофобные катионы [10], например, катионы Скулачева, как мы ранее обсуждали. Это имеет смысл, поскольку мембранный потенциал может приводить к тысячекратному увеличению количества такого соединения, превращая его в большую угрозу для клетки. Однако все опубликованные субстраты множественной лекарственной устойчивости для грамположительных видов, таких как *B. subtilis* [11] или *S. aureus*, были синтетическими: этидиумбромид, бензалколниумхлорид, хлоргексидин и др. Это навело на мысль, что Природа тоже произвела такие соединения, но как их найти? Тот факт, что бактерии защищают себя от таких веществ с помощью MDR-насосов означает, что они являются неэффективными антибиотиками. Имея это в виду, я вооружился толстым томом каталога фирмы «Merck» и пролистал его, ища соединения, которые могли быть гидрофобными катионами естественного происхождения, но без известной антимикробной активности. Это довольно быстро привело меня к бербериновым алкалоидам, вырабатываемым многими растениями. Берберин очень напоминал этидиумбромид, и он представлял собой четвертичный аммонийный алкалоид, который способен интеркалироваться в молекулу ДНК. Мы приобрели этот продукт в фирме «Sigma» и показали, что берберин обладает ярко выраженной активностью против грамположительных бактерий при условии нокаутирования их MDR-насосов [10]. Берберин накапливается в клетке благодаря мембранному потенциалу [12], повреждает мембрану и встраивается в ДНК. Если бы не MDR-насосы, растение пришло бы к идеальному состоянию в плане защиты от микроорганизмов – мембрана и ДНК являются несменяемыми мишенями. Но почему растение продолжает вырабатывать антимикробные препараты, от которых бактерии так хорошо защищены? Что еще более важно, что в идеале должно делать растение, чтобы усилить действие берберина? Позвольте мне остановиться здесь на минутку, чтобы описать, как возник такой вопрос. Российский инженер Генрих Альтшуллер решил формализовать процесс изобретения, выработав набор правил и изложив его в тонкой книжке, которую я прочел, будучи еще студентом. На мой взгляд, главная идея Альтшуллера заключалась в том, чтобы отключить здравый смысл, который мешает нам задать правильный вопрос («не идите в этом направлении, так как это не имеет смысла»). Его наиболее полезное правило

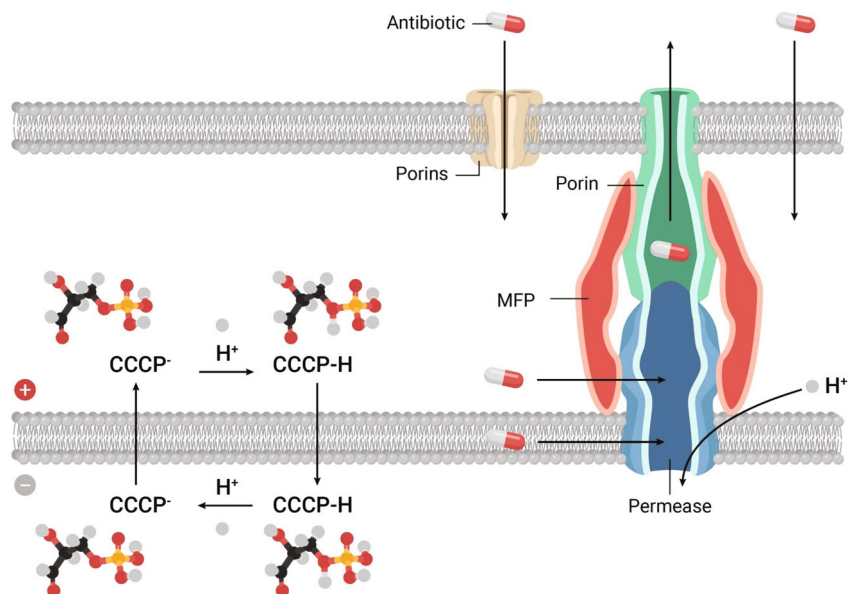


Рис. 1. Открытие трансмембранного насоса. Протонофор (CCCP) рассеивает протон-движущую силу (pmf), перемещая протоны через цитоплазматическую мембрану. У грамотрицательных бактерий MDR-насосы выкачивают химически разнородные амфипатические соединения, такие как CCCP, через внешнюю мембрану, служащую в качестве барьера проницаемости. (С цветными вариантами рис. 1–7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

заклучалось в том, что нужно сформулировать результат, который вы в идеале хотите получить, не беспокоясь о технической осуществимости. Как только вы ответите на этот вопрос, вы сможете понять, как заставить его работать. Как выразился Альтшуллер: «... если ваш идеальный результат звучит абсурдно, значит вы на правильном пути». Альтшуллер имеет международное признание. Его метод TRIZ широко используется (есть на этот счет хорошая статья в Википедии), но не в биологии. Я переформулирую его идеальный результат, чтобы задать вопрос с точки зрения живого организма, в рассматриваемом нами частном случае, что в идеале должно делать растение, чтобы усилить действие берберина? Хорошо, оно должно отключить MDR-насос, создав ингибитор MDR. Мы решили отыскать этот недостающий ингибитор путем фракционирования растения барбариса и определения активности в присутствии субингибирующих концентраций берберина. Это привело нас к открытию метоксигидрокарпина (МНС), мощного ингибитора MDR-насосов [13]. Берберин и МНС вместе образовывали высокоэффективную синергичную пару. Интересно, что берберин используется как в китайской медицине, так и традиционной медицине североамериканских индейцев. Он продается без рецепта и принимается перорально и, вероятно, может оказывать модулирующее влияние на микробиом, что, как я надеюсь, может принести нам пользу. Ограниченное проникновение в эпите-

лиальные клетки пищеварительного тракта делает его безопасным. Способность интеркалироваться в ДНК не является хорошим качеством для системного терапевтического средства. Другой гидрофобный катион действительно стал лекарством. Профессор Скулачев использовал отличную идею использовать TPP^+ , чтобы направить один из лучших природных антиоксидантов (пластохинон) в митохондрии, которые служат основным источником активных форм кислорода (АФК) у человека. Пластохинон функционирует в электрон-транспортной цепи хлоропластов, в которой образуется O_2 , и может восстанавливать АФК. Поскольку пластохинон может восстанавливаться электрон-транспортной цепью как хлоропластов, так и митохондрий, он является обновляемым антиоксидантом. Химера в виде пластохинон- TPP^+ , называемая SkQ1, под действием мембранного потенциала накапливается в митохондриях и, действуя как антиоксидант и также мягко уменьшая протон-движущую силу, способствует снижению уровня АФК [14]. Он нашел применение как антиоксидант для лечения болезни сухих глаз и может также обладать свойствами для сопротивления процессу старения.

Хотя было довольно легко найти ингибиторы MDR-насосов у грамположительных бактерий, основанная клиническая потребность заключается в направленном воздействии на AcrAB-подобные MDR-насосы семейства RND грамотрицательных видов. Это оказалось неп-

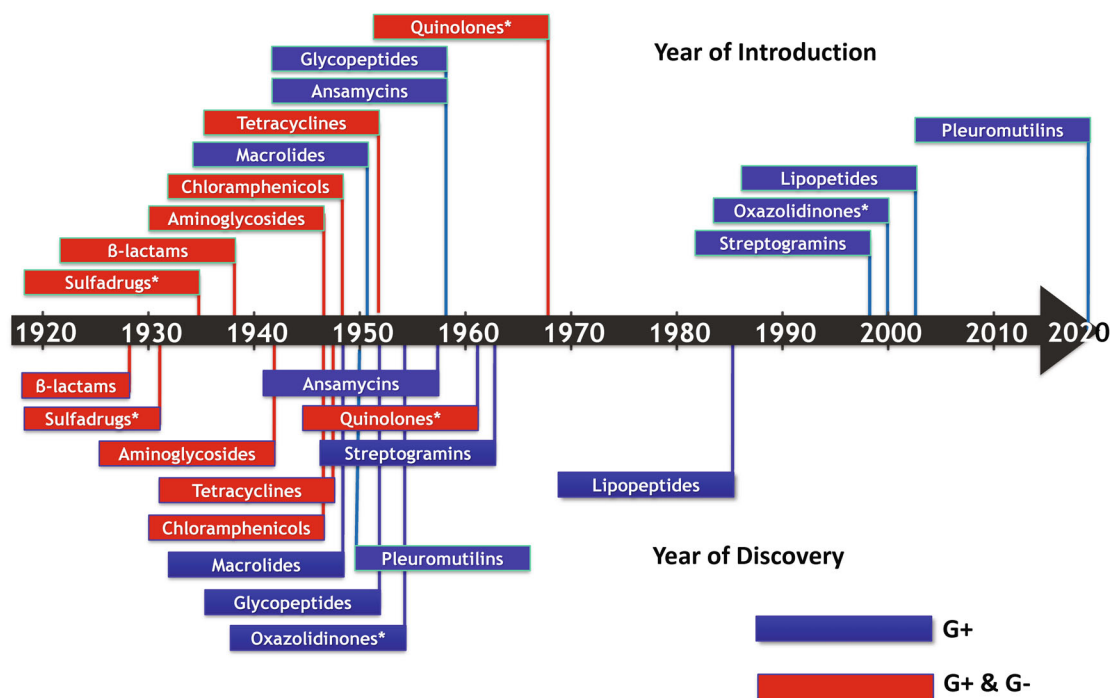


Рис. 2. Хронология открытия антибиотиков. Отмечены год открытия основных классов антибиотиков (нижняя панель) и год, когда они были внедрены в клиническую практику (верхняя панель). * Обозначает синтетические соединения. Синий цвет – узкий спектр действия; красный цвет – широкий спектр действия

ростой задачей, и после многих лет усилий ряда групп мы до сих пор не имеем ингибитор MDR-насосов, который мог бы охватывать насосы из различных видов и при этом быть нетоксичным. Если бы мы хотели что-то изменить, то нам нужно было бы найти антибиотики, которые могли бы обойти MDR-насосы.

В ПОИСКАХ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Изучение MDR-насосов привело меня к знакомству с учеными из фармацевтических компаний – Pfizer, Merck, Wyeth, Novartis и Astra Zeneca. Их основные усилия были направлены на создание аналогов уже существующих соединений, которые действовали бы против устойчивых к лекарствам бактерий или же они улучшали бы фармакологические свойства этих соединений. Также был достигнут консенсус в отношении того, что для надлежащего решения проблемы резистентности потребуются новые соединения. Интересно, когда в последний раз профессор, работающий в научной лаборатории, открыл полезный антибиотик? Это случилось в 1944 г., когда Waksman Z. открыл стрептомицин [15]. Последним новым антибиотиком, внедренным в клиническую практику, был антибиотик ограниченного спектра действия даптомицин (действующий только против грамположительных бакте-

рий), открытый Lully Eli в 1978 г. (рис. 2). Все это не особо воодушевляло, но выглядело очень захватывающе (см. [16] для подробного ознакомления с историей открытия антибиотиков).

Waksman открыл стрептомицин путем проведения простого систематического скрининга почвенных актиномицетов на чашке Петри, покрытой искомым патогеном, для обнаружения зон ингибирования. После открытия стрептомицина, который стал первым лекарством, использованным для лечения туберкулеза, дополнительные широкомасштабные промышленные скрининги привели к обнаружению других аминогликозидов, а также тетрациклинов, хлорамфениколов, макролидов и других соединений. Началась золотая эра открытия антибиотиков, но она длилась недолго. Уже к 1960 г. открытие новых веществ в значительной степени завершается. Помимо случайно обнаруженных фторхинолонов, начиная с 1960-х гг., не было открыто ни одного антибиотика широкого спектра действия, способного действовать против грамотрицательных видов. Неудивительно, что патогены продолжали приобретать устойчивость, и мы оказались в эпицентре кризиса устойчивости к антимикробным препаратам. Бактерии, кажется, использовали все логические возможности для развития устойчивости: разрушение антибиотика, пониженная проницаемость, откачивание из клетки, изменение мишени, переключе-

ние мишени, секвестрация антибиотика [17]. По мнению ВОЗ, «серьезную озабоченность» вызывают граммотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [18]. Смертность от КРС *K. pneumoniae*, например, равна 40% [19, 20]. У нас есть вполне хорошее объяснение тому, почему золотая эра закончилась. Это результат избытка собранных данных. Антибиотики широкого спектра действия очень ценны для актиномицетов, они легко распространяются среди различных видов благодаря горизонтальному переносу, многочисленны и их легко обнаружить. И все основные классы были открыты к 1950 г.

НЕКУЛЬТИВИРОВАННЫЕ БАКТЕРИИ И ТЕЙКСОБАКТИН

Мир микробов гораздо больше актиномицетов и, вероятно, таит в себе новые полезные антибиотики. Один очевидный источник, на который нужно обратить внимание, это некультивированные бактерии, которые составляют до 99% всего микробного разнообразия. Размещение капли образца из окружающей среды, содержащей бактерии для их подсчета, и размещение аналогичной капли на чашку Петри показывает, что только 1% клеток образует колонии. Результат этого простого эксперимента известен как «The Great Plate Count Anomaly», определение, которое описывает феномен огромных различий возможностей культивирования различных бактерий. Это самая старая нерешенная проблема микробиологии, начиная с XX в. [21]. За последние 100 лет были предприняты многочисленные попытки повысить выход, изменяя условия культивирования, но это не принесло результата. С точки зрения Альтшуллера, как в идеале вырастить некультивируемые бактерии? В идеале вы выращиваете их там, где, как вы знаете, они растут, а именно, в их естественной среде обитания. Тогда задача состоит в том, чтобы разработать такое устройство, которое позволило бы выращивать чистые культуры бактерий в среде, в которой насчитывается не менее 10^9 клеток/мл.

Мы предположили, что таким устройством может стать обычный диализный мешок, обычно используемый для обессоливания белков. Вместе с моим коллегой Славой Эпштейном мы сделали «камеру для диффузии», в которой бактерии, взятые из окружающей среды, например, из морских отложений почвы, разведены, смешаны с агаром и помещены между двумя непроницаемыми мембранами этого приспособления [22]. Затем камеру возвращают в образец из окружающей среды, откуда были взяты

клетки. Питательные вещества и факторы роста диффундируют из их естественной среды обитания, обманом заставляют бактерии воспринимать это как естественную среду обитания, и они образуют колонии. В результате некультивируемые бактерии начинают расти в лабораторных условиях.

Выход при таком подходе составляет ~50%. Очень удобно, как только в камере образовались колонии, с большой вероятностью они будут расти в обычной среде, и мы называем это «одомашниванием». По-видимому, фактором, ограничивающим рост большинства видов *in vitro*, является образование значительной популяции клеток. В поисках механизма «некультивируемости» мы считали, что факторы роста могут поступать бактериям от их соседей. Чтобы проверить эту идею, мы посеяли густой инокулят из морских осадков на чашку Петри и посчитали, что некоторые колонии могут принадлежать к некультивируемым видам, находящимся вблизи культивируемого микроорганизма. Повторная инокуляция соседних колоний вместе и по отдельности показала, что это действительно является причиной. Фракционирование супернатанта культуры, служившей помощником, и тестирование на индукцию роста некультивируемых бактерий привело нас к факторам роста. Это оказались сидерофоры [23].

В аэробных условиях железо присутствует в виде нерастворимого Fe^{III} . Бактерии выделяют сидерофоры, которые хелатируют Fe^{III} и приносят его в клетку, восстанавливая до Fe^{II} , который далее используется для формирования Fe-S кластеров и гема компонентов дыхательной цепи. Биоэнергетика снова напомнила нам о своем присутствии. Некультивируемые бактерии из таксономически неродственных групп утратили свою способность синтезировать сидерофоры и поэтому они заимствуют их у соседей. Это может сэкономить ресурсы, но приведет к потере свободы – некультивируемые бактерии не могут заселять новые территории. Зависимость от сидерофоров есть у ~10% некультивируемых бактерий из окружающей среды. Казалось, что обнаружение дополнительных факторов роста позволит нам заполнить пробел в вопросе аномалии культивирования бактерий и решить проблему некультивируемых бактерий. Однако этого не случилось. Следующим фактором роста, обнаруженным нами, оказался гемин, составляющий менее 1% некультивируемых видов. Используя аналогичный подход, мы изучили некультивируемые бактерии из микробиома человека. Они составляют ~30% всех видов, обитающих в этой среде. Мы выявили зависимые от помощника пары колоний, но мы не смогли вы-

делить фактор роста. Обычно в качестве помощника выступает *E. coli*. Поэтому воспользовались упорядоченной библиотекой нокаутированных штаммов *E. coli*, провели их скрининг и обнаружили мутантные штаммы, которые не могли выступать в качестве помощников. Оказалось, что они несут делеции в пути биосинтеза менахинона [24]. Это было совершенно неожиданно. Менахинон представляет собой высокогидрофобное вещество и является интегральным мембранным компонентом анаэробной дыхательной цепи, переносящим водород между дегидрогеназами и цитохромами. Добавление менахинона в чашку воспроизводило действие хелперных бактерий, позволяя расти обычно некультивируемым микроорганизмам. Это объяснило, почему нам не удалось выделить фактор роста. Концентрация менахинона в растворе очень мала. Как и в случае сидерофоров, бактерии, которые находятся в строгой зависимости от наличия дыхательной цепи, заимствуют её важный компонент у соседей. Аналогично внешней среде, ~10% некультивируемых кишечных бактерий находятся в зависимости от хинонов, и мы обнаружили только один дополнительный минорный фактор роста. Это оказалась гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), основной нейротрансмиттер [25]. Некультивируемая бактерия, которую назвали *Eutepia gabavorous*, потребляет только ГАМК и больше никаких питательных веществ. Это вполне необычный, если не беспрецедентный, случай в микробиологии. Производители ГАМК, которые были идентифицированы, представляют практический интерес. Мой талантливый аспирант Фил Стрэндвич, который сделал это открытие, создал «Holobiome», биотехнологическую компанию, целью которой является помещение производителей ГАМК в таблетки для лечения целого ряда болезней, таких как тревожность и депрессия (есть недавняя статья в журнале «Science», посвященная фирме «Holobiome», <https://www.sciencemag.org/news/2020/05/meet-psychobiome-gut-bacteria-may-alter-how-you-think-feel-and-act>). Иногда наука уводит нас в неожиданные обходные пути.

Хотя было интересно обнаружить факторы роста, но вопрос, почему же оставшиеся 90% видов не подвергаются культивированию, остается интригующей загадкой, которую предстоит решить.

Помимо изучения фундаментальной научной проблемы, мы оценили потенциал некультивируемых бактерий на предмет продукции вторичных метаболитов, доктор Эпштейн и я основали фирму «NovoBiotic», чтобы правильно их использовать. В результате проведения широкомасштабного скрининга был обнаружен

ряд новых антимикробных препаратов, но большинство из них не удалось разработать из-за токсичности, нестабильности и других проблем. Это общая проблема истощения, возникающая при открытии новых лекарств. Вещество № 25 (Novo25) продемонстрировало отличную активность против грамположительных бактерий, но провалило важный тест: не было развития резистентности. Отсутствие резистентных мутантов обычно означает неспецифическое соединение, такое как детергент, которое любят производить бактерии. Однако Novo25 не демонстрировал цитотоксичности против клеток млекопитающих [26]. Это поведение совершенно отличалось от действия детергента. Затем мы проделали эксперименты по модификации клеток *S. aureus*, начиная с субингибирующих доз Novo25 и повышая ежедневную дозу, но повторяюсь, без возникновения мутантов. Все одобренные на настоящее время антибиотики вызывают возникновение резистентных мутантных клеток в условиях такого эксперимента. Было понятно, что это соединение необычно. Поскольку мы не смогли получить устойчивые мутанты, это предполагало, что Novo25 не действует направленно на белки-мишени. Действительно, белок всегда будет мутировать, чтобы избежать связывания с антибиотиком. Мы сделали ставку на липид II, предшественник пептидогликана, и показали, что добавление в культуральную среду очищенного вещества защищает от действия Novo25. Сейчас теиксобактин (teixos – wall), это вещество является членом нового класса антибиотиков, действующих на клеточную стенку (рис. 3). Он связывается с пирофосфатной группой сахаров (PiPi-sugar) липида II, в то время как природа сахарного остатка не очень важна. Это позволяет теиксобактину связываться со сходным липидом III, предшественником тейхоевой кислоты клеточной стенки. Мишень теиксобактина, пирофосфатная группа сахаров (PiPi-sugar), кажется неподходящей. Действительно, как бы он не обеспечивал избирательность действия, почему же это соединение не связывается с нуклеозидфосфатами, такими как АДФ? Ответ на вопрос лежит в неожиданной сложности механизма связывания, который был недавно описан Weingarh et al., в результате проведенного ими изучения синтетического аналога теиксобактина [27]. Теиксобактин сначала появляется на поверхности клетки и за счет двух гидрофобных остатков закоривается на мембране (рис. 3). Головка кольца слабо связывается со структурой PiPi-sugar липида II, а затем молекулы теиксобактина, связавшиеся с их мишенью, взаимодействуют друг с другом, образуя большую β-складчатую структуру.

Специфичность действия и его сила обусловлены созданием этой супрамолекулярной структуры. L- и D-аминокислоты стратегически располагаются в теиксобактине, чтобы создать антипараллельные цепи β -складчатой структуры, в которой две близлежащие молекулы смещаются, чтобы оставить головную группу свободной для атаки мишени.

Следует отметить, что сайты связывания локализованы на поверхности мембраны, так что теиксобактин не подвергается откачиванию из клетки. Связывание с двумя неизменяемыми мишенями на клеточной поверхности в значительной степени объясняет заметное отсутствие развития устойчивости к теиксобактину. Но всегда есть возможность передачи механизма резистентности с плазмидами, которые часто образуются в организме продуцента. Однако продуцент теиксобактина является грамотрицательной бактерией, *Eleftheria terrae*, и она сама защищает себя от теиксобактина путем его экспорта через внешнюю мембрану. Этот насос является антипортером протонов, сходным с AcrAB у *E. coli*. Организмы, выступающие в качестве мишеней, являются грамположительными бактериями и не могут позаимствовать внешнюю мембрану у продуцента. Антибиотики, конечно, могут быть разрушены ферментами, например, β -лактамазы, расщепляющие пенициллин, однако эти ферменты известны только для обычно встречающихся антибиотиков. Теиксобактин же встречается редко и он является первым примером химического соединения, выработанного таким образом, чтобы избежать развития к нему резистентности.

Когда мы опубликовали статью, то она стала наиболее обсуждаемой работой года (статья в журнале «Science», <http://news.sciencemag.org/scientific-community/2015/12/which-studies-got-most-media-buzz-2015>). Хотя мы оказались не готовы к такому повышенному вниманию, спустя годы можно понять, что способность бактерий вырабатывать устойчивость к антибиотикам была им дана, и осознание того, что старая парадигма может быть ошибочной, дает большие надежды на поиск эффективных путей для разрешения кризиса устойчивости к антимикробным препаратам. Теиксобактин сейчас находится на последней стадии исследований нового лекарства (IND-enabling studies), и через год планируется приступить к клиническим испытаниям на людях.

БИОПЛЕНКИ, СПЯЩИЕ КЛЕТКИ И АТФ

Область исследований бактериальных MDR-насосов, которую мы помогли запустить,

набирала обороты и, как перед этим в случае хемиосмотической теории механизма сопряжения, вступила в стадию кристаллографии белка и детального изучения структуры и функции белков. Пришло время двигаться дальше.

В поисках хорошей проблемы, над которой стоит поработать, я решил исследовать озадачивающую стойкость к терапии антибиотиками хронических инфекций, ассоциированных с биопленками. Основное наблюдение было простым: бактерии вырабатывают биопленку, массу клеток, покрытую экзополимерами, и как только они это сделают, становится очень трудно лечить инфекцию с помощью антибиотиков. Клетки, отделенные от пленок, однако не росли в присутствии этих антибиотиков. Это означает, что клетки остаются восприимчивыми. В этом нет смысла, это красивый парадокс.

В то время талантливый пост-док Group A. (в настоящее время работает в компании «Merck») пришел в мою лабораторию и выразил желание поработать над этой проблемой. Сначала он провел простой описательный эксперимент, наблюдая гибель пленки, образованной клетками *P. aeruginosa*, под действием офлоксацина в зависимости от времени [28]. То, что он обнаружил, было поразительным: большинство клеток биопленки погибали, однако оставалась небольшая, выжившая субпопуляция клеток, которая казалась непроницаемой для антибиотика (рис. 4) [28, 29]. После повторного выращивания эти клетки не демонстрировали устойчивость, поэтому они не были устойчивыми мутантами. Мне было трудно в это поверить. Основной механизм устойчивости биопленок был ясно виден. Это результат простого эксперимента, который должен был проведен раньше. Мы взяли толстую пачку статей по биопленкам и просмотрели её в поисках эксперимента, который так бы сэкономил время. Разумеется, мы нашли четыре подобных статьи с субпопуляциями выживших клеток. По непонятным мне причинам, эта выжившая популяция ранее была упущена из виду.

Я понял, что мы заново открыли персистирующие клетки, малоизвестный феномен, описанный ирландским микробиологом Bigger J. в 1944 г. [30]. Bigger тестировал недавно внедренный в практику пенициллин против *S. aureus* и обнаружил, что он не стерилизует популяцию. Остающиеся клетки не являлись резистентными мутантными клетками. Они могли снова подвергнуться росту и образовать новую популяцию, которая продуцировала новую фракцию из редких выживших клеток, которые он назвал «персистерами». После того как Bigger опубликовал статью об этой находке в журнале

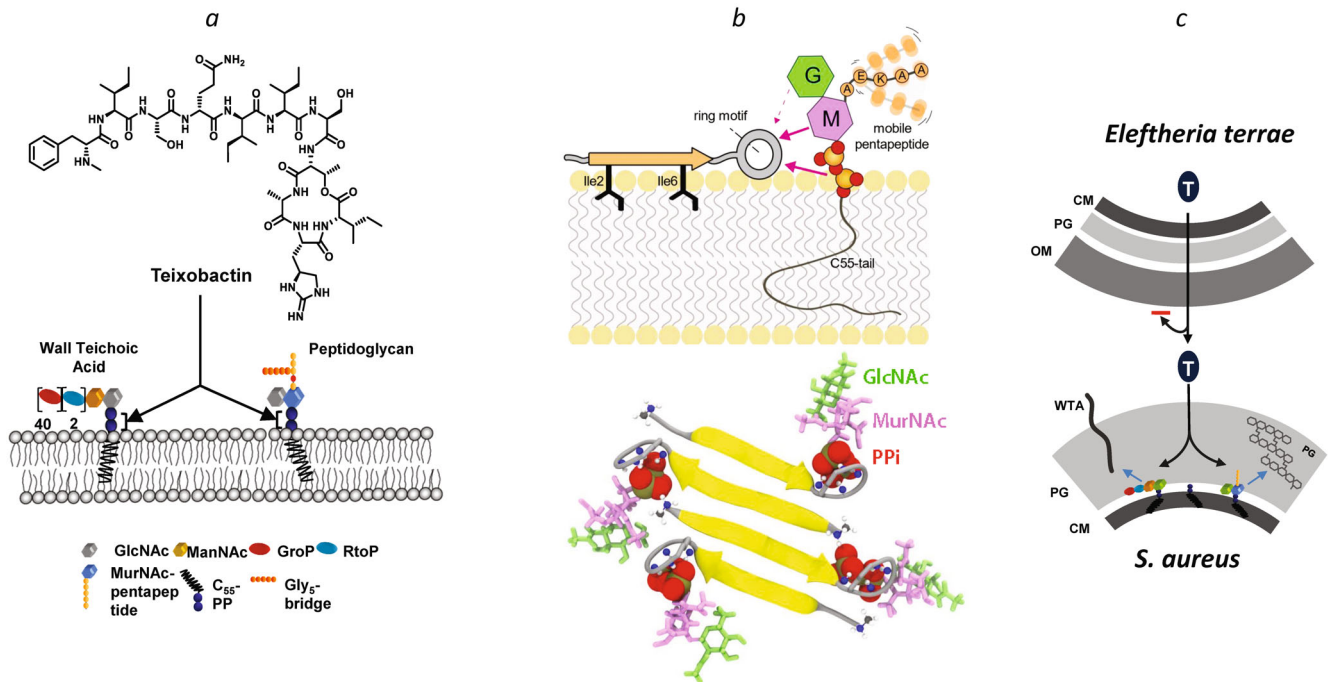


Рис. 3. Механизм действия теиксобактина. *a* – Теиксобактин связывается с липидом II, предшественником пептидогликана, и липид III, предшественник тейхоевой кислоты клеточной стенки; *b* – теиксобактин связывается с пирофосфатной группой сахара (PPi-sugar) липида II, и образуется большая β -складчатая структура из антипараллельных молекул, с образованием супрамолекулярной структуры, которая объясняет высокую специфичность и силу действия антибиотика; *c* – *E. terrae*, грамотрицательная бактерия, продуцирует теиксобактин и экспортирует его через внешнюю мембрану с помощью трансмембранного насоса. Эта большая молекула теиксобактина не может диффундировать обратно через внешнюю мембрану, которая и обеспечивает защиту от этого вещества. Грамположительная бактерия, являющаяся мишенью, не имеет внешней мембраны и открыта для действия теиксобактина

«Lancet», она была быстро забыта. Спустя сорок лет Moyed воскресил персистирующие клетки и при работе с *E. coli* произвел простой отбор, чтобы выяснить лежащий в основе этого явления механизм. Добавив ампициллин к растущей культуре, он собрал выжившие клетки и повторил процедуру, отобрав мутанты, что увеличило концентрацию персистирующих клеток. Он был действительно способен выделять такие «высокоперсистирующие мутанты» – *hip* и картировал их в локусе *hipVA* [31]. Мутация с усилением функции в *HipA* (*hipA7*) приводила к образованию клеток, которые производили в 1000 раз больше персистирующих клеток. Однако нокаут локуса *hipVA* не оказывал влияния на образование персистеров. Эта линия расследования зашла в тупик и снова о персистерах забыли.

Присутствие персистирующих клеток объясняло фенотип биопленки и вместе с этим в целом основное важное свойство хронических инфекций. Общей чертой хронических инфекций является способность патогена спрятаться от иммунной системы. Экзополимеры биопленки защищают клетки от основных компонентов иммунной системы, *M. tuberculosis* скрывается в макрофагах, и *H. pylori* вызывает инфекцию в

желудке, в значительной степени избегая иммунного ответа. Персистирующие клетки выживают при действии антибиотиков, и как только их концентрация понизится, восстанавливают свою популяцию, способствуя рецидиву хронических инфекций. Это было наше предположение, но проверить его оказалось очень сложно. Персистеры образуют небольшую и временную субпопуляцию, и поэтому неясно как провести эксперимент *in vivo*, связав их с устойчивостью к

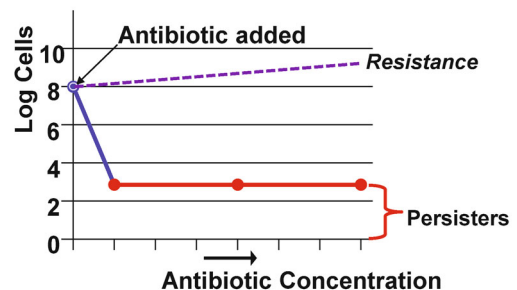


Рис. 4. Персистирующие клетки. Популяция бактерий, устойчивая к антибиотику, будет расти в его присутствии. Если штамм нерезистентен, то основная часть клеток погибает, оставляя небольшую фракцию устойчивых к антибиотику персистирующих клеток

лекарствам. Ключ к решению этой проблемы пришел из старого эксперимента Moyed, описанного выше, в котором популяцию обрабатывали высокими концентрациями антибиотика. Затем ей давали возможность снова расти, и после нескольких циклов происходило обогащение мутантных по *hip* клеток. Но это именно то, что происходит тогда, когда людей лечат антибиотиками. В каком-то смысле миллионы людей участвовали в этом эксперименте, и все, что нам надо было сделать, это посмотреть на его результаты. Мы поставили цель найти мутантные по *hip* клетки среди клинических изолятов, взятых у больных с хроническими инфекциями. Их мы могли легко обнаружить. Например, почти половина всех изолятов *P. aeruginosa* от больных муковисцидозом, когда инфекция длится десятилетиями, были *hip*-мутанты [32]. Важно, что многие из *hip*-мутантов не несли мутации, ассоциированные с резистентностью. Это значит, что выживание в присутствии антибиотиков благоприятствует персистирующим клеткам, связывая их таким образом с сопротивлением хронической инфекции. Далее мы показали, что *hip*-мутанты отбираются в ходе лечения больных туберкулезом [33] и при рецидиве инфекции мочевыводящих путей, вызванной *E. coli* [34]. В случае *E. coli*, значительное количество изолятов *hip* несут прирост функциональных мутаций в токсине HrpA, что Moyed обнаружил много лет назад. Хотя мы все еще не знаем, какова естественная функция HrpA, то он конкретно играет роль в клинической резистентности антибиотиков. HrpA является модулем токсин/антитоксин. HrpA является протеинкиназой [35], которая фосфорилирует глутРНК синтазу, ингибируя трансляцию [36]. Мы также определили механизм мутации с усилением функции *hipA7*. HrpA образует неактивный димер, и мутация ослабляет взаимодействие между субъединицами, позволяя АТФ достичь активный центр киназы. Исходя из этого механистического понимания, мы дали название этому феномену как «наследуемая множественная лекарственная резистентность», по аналогии с наследуемой резистентностью [34].

Как же персистеры, которые не образуются через HrpA7, выживают при антибиотиках, остается загадкой, которую мы были намерены разгадать. Имеются много модулей ТА различных классов, которые разбросаны по хромосомам бактерий, однако их функция остается невыясненной. Мы подумали, что если бы мы смогли идентифицировать модуль ТА в клетках *E. coli*, индуцируемый при определенных условиях, тогда он станет основным компонентом, ответственным за образование персистеров. Глядя на

вышележащие последовательности известных модулей ТА, наше внимание привлек модуль TisAB, так как промоторный участок содержал Lex-бокс. Lex-бокс является участком оператора для связывания репрессора LexA, являющегося глобальным регулятором SOS-ответа. При повреждении ДНК происходят расщепление LexA и активация экспрессии ферментов репарации ДНК. Tobin Dorr, мой талантливый аспирант (сейчас работает в Корнелльском университете), занялся этим проектом и обнаружил, что повреждения ДНК фторхинолоновыми антибиотиками вызывают экспрессию токсина TisB и ассоциированное с ним формирование персистирующих клеток [37]. TisB представляет собой необычный токсин. Он является эндогенным антимикробным пептидом. Это выглядит как оксиморон. Функцией антимикробных пептидов является выход за пределы клетки, в которой они синтезируются, и убийство других бактерий. Эти соединения относятся к различным классам, но общей для них темой является короткий гидрофобный катионный пептид, который образует в мембране ионный канал, разрушает протондвижущую силу (pmf) и, в конечном итоге, убивает клетку. В сотрудничестве с Сергеем Безруковым, ведущим экспертом в области ионных каналов, работающим в Национальном институте здоровья (НИИ), мы показали, что встраивание TisB в искусственную «черную мембрану» приводит к образованию типичных потенциал-зависимых ионных каналов [38]. Повидимому, *E. coli* использует две совершенно различных системы защиты, чтобы избежать гибели от агентов, повреждающих ДНК. Большинство клеток экспрессируют репарационные ферменты и пытаются выжить. Небольшая часть экспрессирует TisB, который понижает мембранный потенциал, вызывая падение уровня АТФ и нарушение функционирования основных биосинтетических путей, переводя клетки в состояние покоя. Основные биосинтетические пути являются также основными мишенями для действия бактерицидных антибиотиков – синтез пептидогликана/пенициллин-связывающие белки (β -лактамы), биосинтез белка/рибосома (аминогликозиды) и синтез ДНК/ДНК-гираза. Бактерицидные антибиотики убивают в результате нанесения повреждений их мишеням, но не их ингибирования (рис. 5).

Например, аминогликозиды вызывают гибель клеток в результате нарушения процесса трансляции, и токсинные неправильно свернутые пептиды убивают клетку. В клетке, находящейся в состоянии покоя, концентрация АТФ мала, активность подавлена и ничего нет, чтобы повреждать.

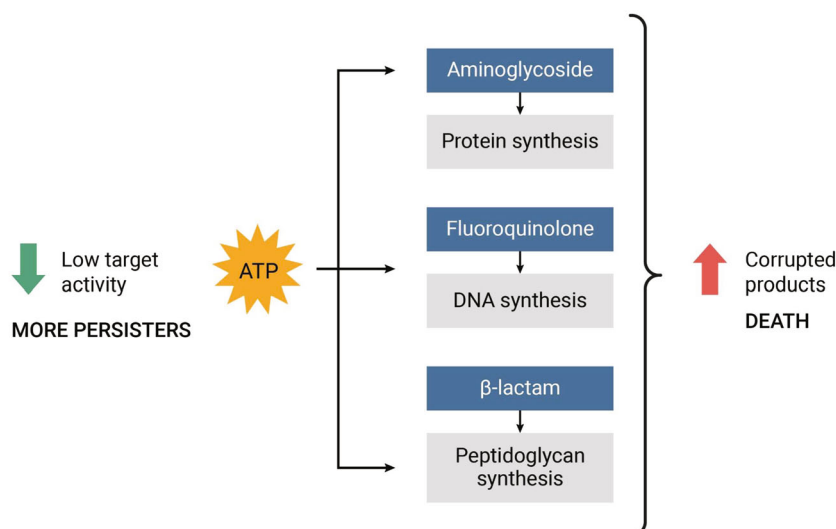


Рис. 5. Низкоэнергетическая теория образования персистирующих клеток. Бактерицидные антибиотики повреждают активные мишени и убивают клетку. Если концентрация АТФ мала, то происходит образование устойчивых к лекарствам персистирующих клеток, которые выживают

Открытие функции TisB дало ключ к разгадке образования персистеров в обычной, не подвергающейся стрессу популяции. Мы знали о том, что больше всего персистеров имеется в стационарной популяции, в которой уровень АТФ низок. Казалось, что персистеры могут быть редкими клетками, в которых падает уровень АТФ из-за стохастических вариаций уровня экспрессии энергопроизводящих компонентов [39, 40]. Оказалось, что это так. Мы обнаружили, что отсортированные клетки с низким уровнем экспрессии ферментов цикла Кребса устойчивы к действию антибиотиков [41].

«Низкоэнергетический» механизм образования персистирующих клеток (рис. 5) прост и достаточно очевиден. Действительно, мы давно знали, что для того, чтобы убить клетку, антибиотики нуждаются в активных мишенях, и что снижение уровня АТФ, без сомнения, будет приводить к переходу клеток в состояние покоя и возникновению у них толерантности к действию лекарств. Я действительно думал о такой возможности около десяти лет назад и считал это невероятным. В то время стали выходить работы, описывающие стохастическую вариативность клеточных фенотипов, и классическим примером выступал репрессор Lac. В одной клетке *E. coli* было только ~10 молекул этого репрессора, и будут значительные вариации в его содержании в различных клетках в популяции из-за неизбежного шума в экспрессии. С другой стороны, предполагалось, что белки, присутствующие в больших количествах, будут свободны от такого шума, ассоциированного с уровнями их экспрессии. Теперь же мы знаем, что это не так. Повышенная экспрессия фер-

ментов, генерирующих энергию, сопровождается шумом и приводит к образованию персистеров.

ЧТОБЫ УБИТЬ СПЯЩУЮ КЛЕТКУ

Как вы можете убить персистера? Ответ очевиден. Вы не сможете это сделать. Все известные антибиотики не способны убить персистирующие клетки, и теперь мы понимаем почему. Потому что это спящие клетки с неактивными мишенями. Похоже идеальный тупик в деле открытия лекарств.

Игнорируя реальность, полезно задаться вопросом: как в идеале будет работать соединение против персистеров? Такое соединение должно разрушить важную мишень и убить клетку без привлечения АТФ. Исходя из этого, на ум приходит старый забытый антибиотик — ацилдепептид (ADEP). Он был открыт Lilli в 1985 г. Это соединение продуцировалось *Streptomyces hawaiiensis*, и оно обладало выраженной активностью по отношению к грамотрицательным патогенам. Однако компания вела поиск антибиотиков широкого спектра действия, и поэтому это соединение было оставлено без внимания. Механизм его действия был изложен в работе [42], и он привлек наше внимание. ADEP направленно действует на бактериальную протеазу ClpP, которая распознает неправильно собранные белки с помощью АТФ-зависимого шаперона и переваривает их. ADEP поддерживает поры протеазы открытыми, которая может теперь переваривать входящие пептиды без затрат АТФ (рис. 6). Казалось, что это идеально со-

понять свойства, которые благоприятствуют проникновению [48]. В двух работах Paul Hergenrother и его команда измерили проникновение большого числа неродственных соединений внутрь клетки *E. coli*, выстроили их по способности к проникновению и с помощью хемоинформатики пришли к «правилам проникновения» [49, 50]. Некоторые из параметров были установлены раньше: предел значения мол. веса, равный 600 Да, и низкая гидрофобность, $c\text{LogP}$, равная $-0,1$ [51], но дополнительные параметры интересны и совсем не очевидны: низкое число вращаемых связей (жесткая структура), низкая степень объемности (плоская фигура — это хорошо) и положительный заряд в виде аминогруппы ($-\text{NH}_3^+$). Все они хороши для проникновения. Предельный молекулярный вес определяется диаметром поринов внешней мембраны. Низкое значение гидрофобности, жесткая структура, плоская/вытянутая форма и положительный заряд. Все это, по-видимому, способствует прохождению через отрицательно заряженные β -бочонки поринов. Это новые правила, которые, вероятно, будут уточняться и расширяться.

Использование правил проникновения необходимо для проведения рационального дизайна антибиотиков. Неизвестно, когда это станет реальностью. В настоящее время открытие антибиотика естественного происхождения выглядит более реалистичной ставкой. Соединения, действующие против грамотрицательных бактерий, были усиленно проанализированы, но только актиномицеты и другие группы бактерий должны были разработать свои собственные соединения, с помощью которых они могли действовать против грамотрицательных конкурентов. Но где искать этих продуцентов? Обычно скрининг начинается с клеток, которых получают из 10 г почвы. При этом неизвестно, содержится ли в образце продуцент лидерного соединения лекарства (drug lead). Повторение этого процесса много раз все равно не скажет нам ничего о возможности обнаружения чего-нибудь интересного. В идеале хотелось бы просеивать не граммы почвы, а всю биосферу. Это звучит как фантастика, но выход есть: скрининг уже произведен.

Предположим, что есть группа бактерий, у которых требования к антибиотикам похожи на

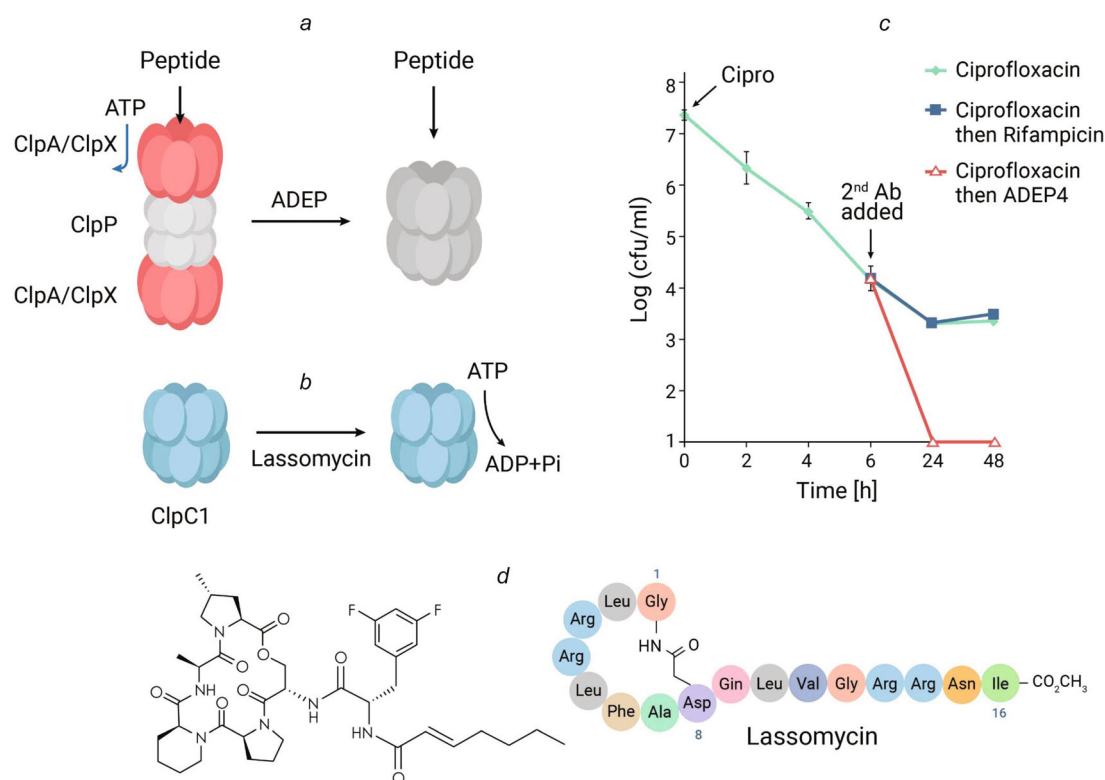


Рис. 6. Соединения, действующие против персистирующих клеток. *a* — Ацилдепептид поддерживает поры протеазы ClpP из *S. aureus* и других грамположительных бактерий в открытом состоянии, принуждая клетку к самоперевариванию; *b* — лассомицин активизирует процесс гидролиза АТФ с помощью шаперона C1 протеазы ClpP1P2C1 микобактерий, снижая количество АТФ до точки невозврата; *c* — ципрофлоксацин и рифампицин убивают популяцию клеток *S. aureus*, оставляя неповрежденными персистирующие клетки; АДЕР стерилизует культуру; *d* — АДЕР4, более активный аналог природного АДЕР; и лассомицин

ответствует тому, что мы искали, но возникла проблема.

Были две статьи, в которых предполагали, что ADEP будет действовать только против активно растущих клеток. В одной работе сообщалось, что ADEP-ClpP действует только против образующихся пептидов, выходящих из рибосомы [43], а в другой провозглашалось, что первичной мишенью является EnvZ, белок, который образует разделительное кольцо в процессе деления [44]. Оба процесса имеют место в активно растущих клетках. Оказалось, что мое представление об ADEP было ошибочным.

Однако была одна проблема с этими исследованиями. В них протеолиз изучали в минутной временной шкале, типичной для биохимических экспериментов. Но антибиотики действуют в течение часов и дней. Kondon, талантливый пост-док, который сейчас работает в университете Северной Каролины, проверил действие ADEP (который нам пришлось синтезировать на заказ). Он проинкубировал ADEP со стационарной культурой *S. aureus* в течение 24 ч. В результате более 400 зрелых белков подверглись массовому протеолизу. ADEP заставил клетку переварить саму себя [45].

Последующие эксперименты показали, что ADEP стерилизует популяцию *S. aureus in vitro* и на мышинной модели инфекции. Замечательные свойства этого соединения указывают путь в борьбе с хроническими инфекционными заболеваниями, от которых у нас нет сейчас адекватного лечения (именно поэтому они хронические). ADEP, однако, не обладает выраженными фармакологическими свойствами, он довольно нестабилен *in vivo* и имеет проблемы с токсичностью. Биотехнологическая компания «Arietis» производит сотни аналогов ADEP и близка к определению кандидата на клинические испытания [46].

Другое соединение для уничтожения персистеров было получено в ходе нашего скрининга некультивируемых бактерий против *M. tuberculosis* [47]. Самой большой проблемой при поиске натуральных антибиотиков является огромный фон из токсичных или в меньшей степени известных соединений. В идеале было бы хорошо знать, содержит ли экстракт многообещающее новое соединение до того, как проводить какие-либо химические анализы. Одним из решений этого, казалось бы, невероятного предположения является проведение скрининга на специфичные соединения. Некоторые инфекционные заболевания вызываются единичными патогенами, и высокоспецифичное соединение было бы очень желательно. Помимо лишнего микробиома, мишень для такого сое-

динения, специфичного в отношении определенной группы бактерий, должна отсутствовать у человека, и тогда соединение будет нетоксичным. Мы провели скрининг экстрактов некультивируемых видов бактерий на способность выступать против *M. tuberculosis* и защищаться от *S. aureus*. Этот скрининг был основан на предположении, что природа действительно производит селективные соединения. Поскольку природные антибиотики, специфичные в отношении *M. tuberculosis*, были фактически неизвестны, любой активный экстракт может содержать новое и интересное соединение, и мы должны это знать, прежде чем заниматься какой-либо химией. В результате проведения этого скрининга были обнаружены несколько новых соединений, включая лассомицин.

Лассомицин является пептидом со структурой типа «лассо». Резистентные мутанты были локализованы в гене, кодирующем шаперон C1 протеазы ClpP1P2C1 из *M. tuberculosis*. Эта протеаза является эссенциальной и имеет только отдаленное родство с протеазами ClpP из других бактерий, объясняя специфичность действия соединения против микобактерий. Шаперон C1 распознает неправильно свернутые пептиды и с помощью АТФ питает ими протеазу. Мы обнаружили, что лассомицин резко активизирует АТФазу шаперона. Лассомицин также способен убивать персистирующие клетки *M. tuberculosis*. По-видимому, снижения уровня АТФ до точки невозврата приводит к гибели обычных клеток и персистеров.

Неясно, почему протеаза ClpP атакуется различными действующими против персистеров соединениями. Но что мы можем узнать из этих первых примеров, так это общий принцип, который использует природа, чтобы убивать персистеров, надо разрушать гидролазы (рис. 6). Гидролиз сам по себе не нуждается в энергии. В клетке есть много жестко контролируемых гидролаз: протеазы, липазы, фосфатазы и нуклеазы. Они все являются потенциальными мишенями для соединений, направленных против персистеров.

СКРИНИГ ПЛАНЕТЫ ЗЕМЛЯ

Учитывая их мощный барьер, препятствующий проникновению, неудивительно, что сложно найти антибиотики, действующие против грамотрицательных бактерий. Из-за отсутствия успехов в разработке ингибиторов MDR-насосов, стало понятно, что к этой проблеме можно подойти с противоположной стороны: тестировать различные по структуре соединения, чтобы

наши: активность против грамотрицательных патогенов, низкая токсичность и хорошая фармакокинетика (ПК), т.е. способность перемещаться через ткани без быстрой изоляции и разрушения. Эта группа бактерий собрала бы антибиотики, в которых мы заинтересованы, из биосферы путем горизонтального переноса ДНК. Эти соображения приводят нас к нематофильным бактериям. Симбионты нематод, *Photorhabdus* и *Xenorhabdus*, являются членами микробиома кишечника и близкородственны другим энтеробактериям, таким как *E. coli*. Нематоды вторгаются в личинки насекомых и вытесняют их симбионтов. Нематофилы сначала продуцируют нейротоксины, чтобы обездвижить свою добычу. Затем они высвобождают различные антимикробные агенты, чтобы отразить вторжение микроорганизмов из окружающей среды [52, 53]. Однако самые непосредственные конкуренты, вероятно, происходят не из окружающей среды, а от представителей кишечника нематод. Интересно, что грамотрицательные бактерии, которые обычно являются условно патогенными микроорганизмами человека, присутствуют в большом количестве в микробиоме энтомопатогенных нематод [54]. Антимикробные вещества нематофильных бактерий должны быть нетоксичными для нематод и должны быть способны распространяться хорошо через ткани личинки. Это предполагает антимикробные соединения с низкой токсичностью и хорошей фармакокинетикой, активные против грамотрицательных патогенов.

Мы провели скрининг небольшой коллекции (~20 видов) культур *Photorhabdus* на предмет появления зон ингибирования на агаре, покрытом *E. coli*. Большинство из протестированных бактерий не демонстрировали появления зон ингибирования, что могло быть следствием слабой экспрессии «молчащих» кластеров генов биосинтеза (BGCs) *in vitro*. Концентрированный экстракт из *P. khanii* приводил к появлению небольшой зоны ингибирования роста *E. coli* на чашке Петри, но на росте колонии это не отразилось. Мы выделили этот антибиотик и определили его мол. вес с помощью метода масс-спектрометрии, который оказался равен 966 Да [55]. Это немного больше, чем предельное значение в 600 Да для проникновения соединений через внешнюю мембрану, что нас озадачило. Структурный анализ показал, что это соединение представляет собой сильно измененный 7-мерный пептид (рис. 7).

Мы назвали это соединение даробактином от греческого и русского слова «дар». Он содержит два слитых кольца. Одно из них образовано в результате связывания неактивных атомов уг-

лерода между триптофаном и лизином. Для этого потребуется свободно-радикальная реакция, и BGC действительно включает «радикальный SAM» фермент DarE. Мутантные клетки, резистентные к даробактину, были картированы на BamA, важный шаперон, который сворачивает порыны и встраивает их во внешнюю мембрану. Это решает загадку, связанную с размером. Мишень находится на поверхности, освобождая даробактин от необходимости проникнуть внутрь. BamA является белком с β -бочонком, который ферментом не является и не имеет упорядоченный активный центр, на который мог бы целенаправленно влиять ингибитор. Действительно, значительные усилия, потраченные на нацеливание на BamA путем проведения скрининга библиотек синтетических соединений, оказались неудачными, и это типичная «непоколебимая» мишень. Себастьян Хиллер, ведущий эксперт в области структурно-функциональных взаимосвязей шаперонов и в то же время наш партнер, получил кристаллическую структуру комплекса даробактина и BamA (см. Hunder et al., в обзоре). Это одна из самых красивых структур, которые я когда-либо видел, и она полна сюрпризов. Два связанных кольца даробактина выглядят как хорошая боеголовка для поражения мишени. Однако эта «боеголовка» совершенно неожиданно оказалась пептидным остовом молекулы. Образование колец приводит к формированию жесткой β -цепи пространственной структуры пептида. β -складчатые структуры обычны для белков, но отдельные линейные пептиды не образуют β -цепи (рис. 7). Это необычная предварительно сформированная β -цепь затем связывается с β -цепью BamA, который распознает сигнальные последовательности входящих пептидов и ингибирует их поступление. Неудивительно, что мутации, вызывающие резистентность, не происходят в сайте связывания. Этот сайт представляет собой β -цепь, и изменение структуры этой цепи приведет к появлению нефункционального белка. Такие мутации встречаются в других местах, однако непонятно, каким образом они защищают белок от действия даробактина. Эта защита, однако, обходится дорого. Мутантные клетки теряют вирулентные свойства, что является неплохим свойством для лекарства.

Даробактин А оказался первым представителем большого и постоянно растущего класса соединений. Проведенный поиск по базам данных сведений об опероне *dar* выявил 8 аналогов, пять из которых мы опубликовали. Это напоминает мне об открытии аминогликозидов, класса антибиотиков с многочисленными членами. Открытый первым стрептотрицин лекарством

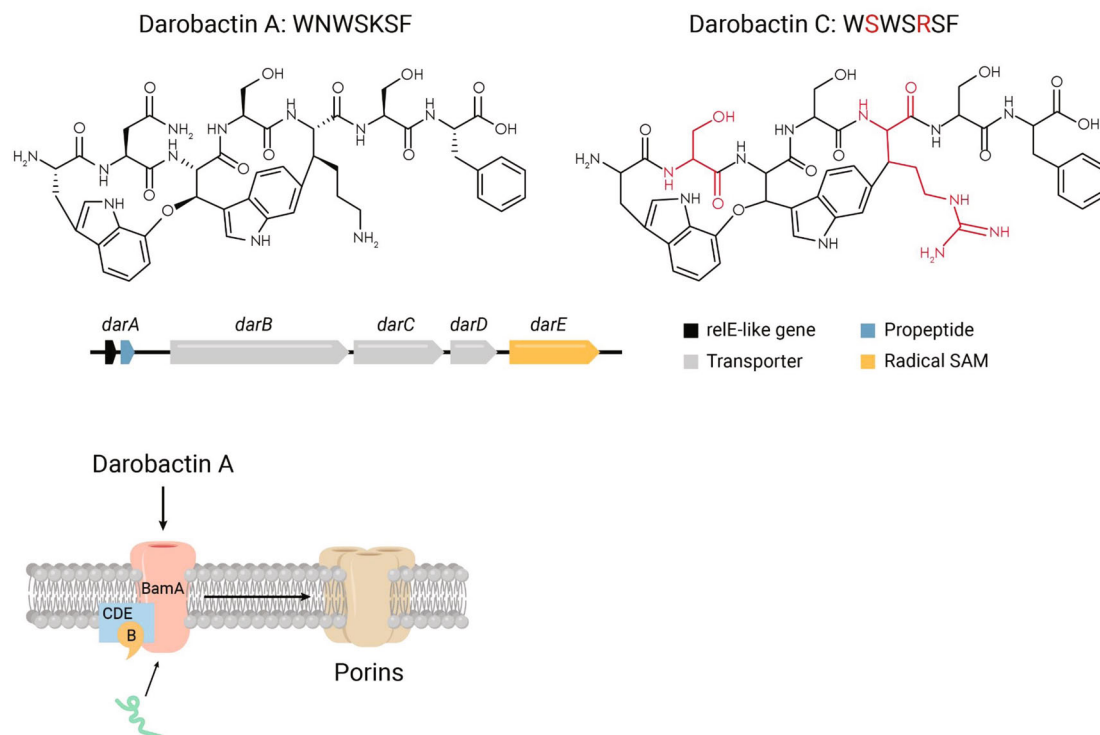


Рис. 7. Механизм действия даробактина. Верхняя панель: даробактин А, продуцируемый различными видами рода *Photorhabdus*, является первым представителем класса, и даробактин С приведен в качестве примера аналога. Оперон *dar* кодирует пропептид, который подвергается модификации ферментом DarE из суперсемейства радикал-образующих ферментов SAM, и транспортер DarCDE экспортирует даробактин. Нижняя панель: даробактин нацелен на шаперон BamA и инсертазу белков внешней мембраны. Предварительно сформированная β -цепь даробактина связывается с β 1-цепью BamA, которая выступает в качестве сайта распознавания входящих белков, блокируя их вход

не стал. Второй, стрептомицин, широко не используется, в то время как открытые позднее гентамицин и тобрамицин являются широко применяемыми лекарствами. Понадобилось 23 года на то, чтобы от стрептотрицина дойти до тобрамицина [56]. Всего несколько дней ушло на то, чтобы идентифицировать 8 аналогов даробактина А с помощью компьютерного анализа. На основании его свойств даробактин А является многообещающим лидерным соединением, но вероятность того, что он станет лучшим лидерным соединением составляет 10%. Нам не нужно получать культуру продуцентов даробактинов В-І. Последовательность достаточна для синтеза оперонов и помещения их в вектор экспрессии в *E. coli*, чтобы их продуцировать.

Мы намеревались провести скрининг биосферы, который уже провел *Photorhabdus*, и открыли даробактин. Откуда он появился? Оперон *dar* имеет необычно низкое содержание GC. Значит эта последовательность определенно появилась в результате горизонтального переноса генов. Мы не знаем, откуда она появилась. *Photorhabdus* возник ~370 млн лет назад. Вероятно, этого достаточно, чтобы обследовать целую биосферу. Что еще они захватили?

ЗАГЛЯДЫВАЯ В БУДУЩЕЕ, РАЗМЫШЛЯЯ О ПРОШЛОМ

Забегая вперед, неплохо было бы принять во внимание уроки, полученные от бактерий, которые имели несколько миллиардов лет, чтобы производить антибиотики. Природные антибиотики могут скорее разрушать, а не ингибировать мишени, что мы наблюдаем на примере ADP-рибозилотрансферазы или аминогликозидов, и кажутся индифферентными к тому, поддается ли мишень действию лекарства (с нашей точки зрения) или нет. Их более упрощенные собратья хороши в ингибировании хорошо структурированных активных центров ферментов. Сравнивая это с тейксобактином, который связывается с пирофосфатной группой сахара липида II, и действует сильно и избирательно, но только потому, что он встраивается в β -решетку супрамолекулярной структуры или с даробактином, который управляет нацеливанием на β -бочонок шаперона, имитируя β -цепь. Современная синтетическая химия (пока) не способна предсказывать соединения с такими сложными механизмами действия. Поэтому мы продолжаем разрабатывать природный антимикробии. Конечно, мы

ищем совершенный антибиотик. Но существует ли он?

Чтобы получить ответ на этот вопрос, рассмотрим арсенал антибиотиков, образуемых тремя различными типами эукариот. Грибы заимствовали их антибиотики широкого спектра действия у бактерий. Это пенициллин и цефалоспорины, оба являются β -лактамами. На первый взгляд ничем не примечательное маленькое животное, коллембол, захватило гены антибиотиков в процессе горизонтального переноса, и они могут кодировать пенициллин и цефалоспорины. В значительно более короткие сроки *H. sapiens* собрал арсенал антибиотиков, и лучшими из них являются пенициллин и цефалоспорины. Эти соединения являются небольшими, водорастворимыми веществами, которые поражают многочисленные пенициллин-связывающие белки – транспептидазы пептидогликанов, которые отсутствуют у человека и являются нетоксичными соединениями. Остающиеся основные классы используемых в клинике антибиотиков, а именно: аминогликозиды, тетрациклины, хлорамфениколы и макролиды, направленно воздействуют на бактериальную рибосому и также действуют против митохондрий с токсическими последствиями. Вероятно, поэтому другие эукариоты передали далее эти соединения. Двигаясь вперед, нам следует брать пример с других эукариот и сосредоточиться на соединениях, которые специфически действуют на бактериальные мишени, такие как теиксобактин и даробактин.

β -лактамы отличные, но не идеальные продукты. Есть многочисленные β -лактамазы, и иногда резистентность появляется вследствие модификации молекулы мишени. Кроме того, эти соединения убивают только растущие клетки. Основной проблемой при открытии антибиотиков является развитие резистентности, поэтому основные классы клинически используемых антибиотиков вовлечены в нацеливание на множество мишеней. β -Лактамы действуют против множественных пенициллин-связывающих белков, фторхинолоны нацелены на гомологичные ДНК-гиразы, и ДНК-топоизомеразы и остающиеся классы антибиотиков действуют против рибосомы, связываясь с рРНК, кодируемыми множественными копиями генов. Эти три

мишени являются малой частью из ~500 значимых белков, имеющихся у бактерий [57, 58], серьезное ограничение для их открытия. Бактерии, по-видимому, решают проблему резистентности путем атаки их соседей комбинациями соединений – β -лактамы + β -лактамаза или хинупристин + дальфопристин. Мы должны делать то же самое, вводя новые соединения не как одиночные продукты, а в виде их сочетаний. Это высвободит все мишени для поиска. Два несовершенных антибиотика будут составлять идеальное сочетание. Соединения против персистеров в сочетании с другим новым антибиотиком будут лечить острые и хронические инфекционные заболевания и будут обладать длительным действием.

Соединения, которые мы обнаружили до сих пор, меняют наше представление об антибиотиках и их мишенях. Теиксобактин бросает вызов старой догме о неизбежности резистентности. Как теиксобактин, так и даробактин поражают недостижимые цели, предполагая, что все мишени являются честной игрой для антибиотиков. Лассомицин и ADEP показывают нам способы убийства «непобедимых» персистеров путем нарушения функционирования их гидролаз. Мы не знаем размер всеобщего антимикробиома, но можем быть уверены, что их число огромно, и они производятся ~ 10^{12} видов бактерий, населяющих нашу планету [59]. Несомненно, многие более удивительные антибиотики еще будут открыты. Их поиск является захватывающей интеллектуальной задачей и уроки, которые я получил много лет назад в лаборатории Скулачева и которые я сейчас передаю своим студентам, нам всем очень пригодятся.

Благодарности. Я благодарен Борису Черняку за его ценные комментарии. Недавние работы в моей лаборатории, описанные в данном обзоре, были выполнены при финансовой поддержке Национального института здоровья (гранты R01 AI118687 и R01 AI141966).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная работа не содержит описания выполненных автором исследований, в которых были бы задействованы люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144-148, doi: 10.1038/191144a0.
2. Mitchell, P. (1966) *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*, Glynn Research Laboratories, Bodmin.
3. Mitchell, P., and Moyle, J. (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation, *Nature*, **213**, 137-139, doi: 10.1038/213137a0.
4. Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of

- mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, doi: 10.1038/2221076a0.
5. Skulachev, V. P., Sharaf, A. A., and Liberman, E. A. (1967) Proton conductors in the respiratory chain and artificial membranes, *Nature*, **216**, 718-719, doi: 10.1038/216718a0.
 6. Williams, R. J. (1961) Possible functions of chains of catalysts, *J. Theor. Biol.*, **1**, 1-17, doi: 10.1016/0022-5193(61)90023-6.
 7. Lomovskaya, O., and Lewis, K. (1992) Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8938-8942.
 8. Lomovskaya, O., Lewis, K., and Matin, A. (1995) EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB, *J. Bacteriol.*, **177**, 2328-2334.
 9. Li, X. Z., Ma, D., Livermore, D. M., and Nikaido, H. (1994) Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1742-1752.
 10. Hsieh, P. C., Siegel, S. A., Rogers, B., Davis, D., and Lewis, K. (1998) Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6602-6606.
 11. Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., and Chen, L. B. (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4781-4785.
 12. Severina, I. I., Muntyan, M. S., Lewis, K., and Skulachev, V. P. (2001) Transfer of cationic antibacterial agents berberine, palmatine and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and *Staphylococcus aureus* membrane, *IUBMB Life Sci.*, **52**, 321-324.
 13. Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A., and Lewis, K. (2000) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1433-1437, doi: 10.1073/pnas.030540597.
 14. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., et al. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
 15. Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S. A. (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 66-69.
 16. Lewis, K. (2020) The science of antibiotic discovery, *Cell*, **181**, 29-45, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.056.
 17. Alekshun, M. N., and Levy, S. B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, **128**, 1037-1050, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004.
 18. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., et al. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *Lancet Infect. Dis.*, **18**, 318-327, doi: 10.1016/s1473-3099(17)30753-3.
 19. Ramos-Castaneda, J. A., Ruano-Ravina, A., Barbosa-Lorenzo, R., Paillier-Gonzalez, J. E., Saldana-Campos, J. C., Salinas, D. F., and Lemos-Luengas, E. V. (2018) Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections, *J. Infect.*, **76**, 438-448, doi: 10.1016/j.jinf.2018.02.007.
 20. Xu, L., Sun, X., and Ma, X. (2017) Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **16**, 18, doi: 10.1186/s12941-017-0191-3.
 21. Winterberg, H. (1898) Zur Methodik der Bakterien-zählung, *Zeitschr. Hyg.*, **29**, 75-93.
 22. Kaerberlein, T., Lewis, K., and Epstein, S. S. (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment, *Science*, **296**, 1127-1129.
 23. D'Onofrio, A., Crawford, J. M., Stewart, E. J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J., and Lewis, K. (2010) Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria, *Chem. Biol.*, **17**, 254-264, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.010.
 24. Fenn, K., Strandwitz, P., Stewart, E. J., Dimise, E., Rubin, S., Gurubacharya, S., Clardy, J., and Lewis, K. (2017) Quinones are growth factors for the human gut microbiota, *Microbiome*, **5**, 161, doi: 10.1186/s40168-017-0380-5.
 25. Strandwitz, P., Kim, K. H., Terekhova, D., Liu, J. K., Sharma, A., et al. (2019) GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota, *Nat. Microbiol.*, **4**, 396-403, doi: 10.1038/s41564-018-0307-3.
 26. Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., et al. (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance, *Nature*, **517**, 455-459, doi: 10.1038/nature14098.
 27. Shukla, R., Medeiros-Silva, J., Parmar, A., Vermeulen, B. J. A., Das, S., et al. (2020) Mode of action of teixobactins in cellular membranes, *Nature communications*, **11**, 2848, doi: 10.1038/s41467-020-16600-2.
 28. Brooun, A., Liu, S., and Lewis, K. (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 640-646.
 29. Spoering, A. L., and Lewis, K. (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *J. Bacteriol.*, **183**, 6746-6751, doi: 10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001.
 30. Bigger, J. W. (1944) Treatment of staphylococcal infections with penicillin, *Lancet*, **ii**, 497-500.
 31. Moyed, H. S., and Bertrand, K. P. (1983) hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis, *J. Bacteriol.*, **155**, 768-775.
 32. Mulcahy, L. R., Burns, J. L., Lory, S., and Lewis, K. (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis, *J. Bacteriol.*, **192**, 6191-6199, doi: 10.1128/JB.01651-09.
 33. Torrey, H. L., Keren, I., Via, L. E., Lee, J. S., and Lewis, K. (2016) High persister mutants in *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One*, **11**, e0155127, doi: 10.1371/journal.pone.0155127.
 34. Schumacher, M. A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N. B., Hansen, S., Vulic, M., Lewis, K., and Brennan, R. G. (2015) HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance, *Nature*, **524**, 59-64, doi: 10.1038/nature14662.
 35. Correia, F. F., D'Onofrio, A., Rejtar, T., Li, L., Karger, B. L., Makarova, K., Koonin, E. V., and Lewis, K. (2006) Kinase activity of overexpressed *HipA* is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **188**, 8360-8367.
 36. Kaspary, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N. Q., and Glaser, G. (2013) HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase, *Nat. Commun.*, **4**, 3001, doi: 10.1038/ncomms4001.
 37. Dorr, T., Vulic, M., and Lewis, K. (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*, *PLoS Biol.*, **8**, e1000317, doi: 10.1371/journal.pbio.1000317.
 38. Gurnev, P. A., Ortenberg, R., Dorr, T., Lewis, K., and Bezrukov, S. M. (2012) Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers, *FEBS Lett.*, **586**, 2529-2534, doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.021.
 39. Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., et al. (2016) Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion, *Nat. Microbiol.*, **1**, 16051, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.51.
 40. Shan, Y., Brown Gandt, A., Rowe, S. E., Deisinger, J. P., Conlon, B. P., and Lewis, K. (2017) ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*, *MBio*, **8**, doi: 10.1128/mBio.02267-16.
 41. Zalis, E. A., Nuxoll, A. S., Manuse, S., Clair, G., Radlinski, L. C., Conlon, B. P., Adkins, J., and Lewis, K.

- (2019) Stochastic variation in expression of the tricarboxylic acid cycle produces persister cells, *MBio*, **10**, doi: 10.1128/mBio.01930-19.
42. Brotz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H. P., Endermann, R., Ladel, C., et al. (2005) Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics, *Nat. Med.*, **11**, 1082-1087, doi: 10.1038/nm1306.
 43. Kirstein, J., Hoffmann, A., Lilie, H., Schmidt, R., Rubsamen-Waigmann, H., Brotz-Oesterhelt, H., Mogk, A., and Turgay, K. (2009) The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease, *EMBO Mol. Med.*, **1**, 37-49, doi: 10.1002/emmm.200900002.
 44. Sass, P., Josten, M., Famulla, K., Schiffer, G., Sahl, H. G., Hamoen, L., and Brotz-Oesterhelt, H. (2011) Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17474-17479, doi: 10.1073/pnas.1110385108.
 45. Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., LaFleur, M. D., Isabella, V. M., et al. (2013) Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection, *Nature*, **503**, 365-370.
 46. Griffith, E. C., Zhao, Y., Singh, A. P., Conlon, B. P., Tangallapally, R., et al. (2019) Ureadepsipeptides as ClpP activators, *ACS Infect. Dis.*, **5**, 1915-1925, doi: 10.1021/acinfed.9b00245.
 47. Gavrish, E., Sit, C. S., Cao, S., Kandrор, O., Spoering, A., et al. (2014) Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2, *Chem. Biol.*, **21**, 509-518, doi: 10.1016/j.chembiol.2014.01.014.
 48. Lewis, K. (2012) Antibiotics: recover the lost art of drug discovery, *Nature*, **485**, 439-440, doi: 10.1038/485439a.
 49. Richter, M. F., Drown, B. S., Riley, A. P., Garcia, A., Shirai, T., Svec, R. L., and Hergenrother, P. J. (2017) Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic, *Nature*, **545**, 299-304, doi: 10.1038/nature22308.
 50. Parker, E. N., Drown, B. S., Geddes, E. J., Lee, H. Y., Ismail, N., Lau, G. W., and Hergenrother, P. J. (2020) Implementation of permeation rules leads to a FabI inhibitor with activity against Gram-negative pathogens, *Nat. Microbiol.*, **5**, 67-75, doi: 10.1038/s41564-019-0604-5.
 51. O'Shea, R., and Moser, H. E. (2008) Physicochemical properties of antibacterial compounds: Implications for drug discovery, *J. Med. Chem.*, **51**, 2871-2878.
 52. Crawford, J. M., and Clardy, J. (2011) Bacterial symbionts and natural products, *Chem. Commun. (Camb.)*, **47**, 7559-7566, doi: 10.1039/c1cc11574j.
 53. Tobias, N. J., Shi, Y. M., and Bode, H. B. (2018) Refining the natural product repertoire in entomopathogenic bacteria, *Trends Microbiol.*, **26**, 833-840, doi: 10.1016/j.tim.2018.04.007.
 54. Tambong, J. T. (2013) Phylogeny of bacteria isolated from *Rhabditis* sp. (Nematoda) and identification of novel entomopathogenic *Serratia marcescens* strains, *Curr. Microbiol.*, **66**, 138-144, doi: 10.1007/s00284-012-0250-0.
 55. Imai, Y., Meyer, K. J., Iinishi, A., Favre-Godal, Q., Green, R., et al. (2019) A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens, *Nature*, **576**, 459-464, doi: 10.1038/s41586-019-1791-1.
 56. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., and Connolly, L. E. (2016) Aminoglycosides: an overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a027029, doi: 10.1101/cshperspect.a027029.
 57. Juhas, M., Eberl, L., and Glass, J. I. (2011) Essence of life: essential genes of minimal genomes, *Trends Cell. Biol.*, **21**, 562-568, doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.005.
 58. Grazziotin, A. L., Vidal, N. M., and Venancio, T. M. (2015) Uncovering major genomic features of essential genes in Bacteria and a methanogenic Archaea, *FEBS J.*, **282**, 3395-3411, doi: 10.1111/febs.13350.
 59. Locey, K. J., and Lennon, J. T. (2016) Scaling laws predict global microbial diversity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 5970-5975, doi: 10.1073/pnas.1521291113.

AT THE CROSSROADS OF BIOENERGETICS AND ANTIBIOTIC DISCOVERY*

Review

K. Lewis

Antimicrobial Discovery Center, Department of Biology, Northeastern University, Boston, MA, USA; E-mail: k.lewis@neu.edu

Received July 10, 2020

Revised August 19, 2020

Accepted August 19, 2020

Dr. Vladimir Skulachev was my mentor, and his pioneering work in the field of bioenergetics inspired the discoveries described in this review, written in the form of a personal account of events. Examining basic mechanisms of chemiosmotic coupling unexpectedly led us to transenvelope multidrug resistance pumps (MDR pumps) that severely limit development of novel antibiotics. One of the major advances of Skulachev and his group was the discovery of the mitochondrial membrane potential with the use of permeant cations such as TPP⁺, which served as electric probes. We describe our finding of their natural counterparts in plants, where they act as antimicrobials. The most challenging problems in antimicrobial drug discovery are antibiotic tolerance of chronic infections caused by dormant persister cells; antibiotic resistance, responsible for the current antimicrobial resistance crisis (AMR); and finding novel compounds acting against Gram-negative bacteria, protected by their powerful multidrug resistance pumps. Our study of persisters shows that these are rare cells formed by stochastic fluctuation in expression of Krebs cycle enzymes, leading to a drop in ATP, target shutdown and antibiotic tolerance. Searching for compounds that can corrupt targets in the absence of ATP, we identified acyldepsipeptide (ADEP) that activates the ClpP protease, forcing cells to self-digest. Growing previously uncultured bacteria led us to teixobactin, a novel cell wall acting antibiotic. Teixobactin avoids efflux by targeting lipid II and lipid III, precursors of peptidoglycan and wall teichoic acid, located on the surface. The targets are immutable, and teixobactin is the first antibiotic with no detectable resistance. Our search for compounds acting against Gram-negative bacteria led to the discovery of darobactins, which also hit a surface target, the essential chaperone BamA.

Keywords: bioenergetics, persisters, antibiotics, acyldepsipeptide, teixobactin, darobactin