——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 577.23:575.826

ИНАКТИВАЦИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ОКСИДАЗЫ bd-I ПРИВОДИТ К СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *Е. coli* К АНТИБИОТИКАМ КЛАССОВ ХИНОЛОНОВ И БЕТА-ЛАКТАМОВ

© 2022 г. Т. А. Серегина^{*a*, *}, К. В. Лобанов^{*a*}, Р. С. Шакулов^{*a*}, А. С. Миронов^{*a*}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com Поступила в редакцию 16.02.2022 г. После доработки 02.03.2022 г. Принята к публикации 02.03.2022 г.

Терминальная оксидаза *bd*-1 *Escherichia coli*, кодируемая генами *cydAB*, катализирует восстановление кислорода до воды с использованием гидрохинона в качестве донора электронов. Помимо *cydAB*, для сборки активной *bd*-1-оксидазы необходимо функционирование еще двух генов – *cydDC*, контролирующих синтез гетеродимерного ATP-связывающего транспортера. Показано, что инактивация фермента *bd*-1 *E. coli* путем делеции генов *cydB* или *cydD* приводит к возникновению сверхчувствительности бактерий к хинолоновым и бета-лактамным антибиотикам. Чувствительность этих мутантов к антибиотикам частично супрессируется при внесении в их геном конститутивно экспрессируемого гена *katG*, кодирующего каталазу, под контролем промотора P_{tet} . К аналогичному эффекту приводит повышение уровня генерации внутриклеточного сероводорода в результате экспрессии гена *mstA*, поставленного под контроль промотора P_{tet} (кодирует фермент 3-меркаптопируват-сульфидтрансферазу). Полученные данные свидетельствуют о важной роли терминальной оксидазы *bd*-1 в защите бактерий от окислительного стресса и бактерицидного действия антибиотиков.

Ключевые слова: *E. coli*, терминальная оксидаза *bd*-I, гены *cydB* и *cydD*, делеции, сверхчувствительность к антибиотикам, окислительный стресс, каталаза KatG, сероводород **DOI:** 10.31857/S0026898422040103

введение

Геном E. coli содержит кластеры генов, кодируюших три шитохромоксидазы: bo' (оперон cvoABCD). bd-I и II (оперон cydAB) и bd-II (оперон appCD) [1]. Эти три фермента функционируют на последнем этапе дыхательной цепи, контролируя сопряжение окисления дыхательных субстратов с четырехэлектронным восстановлением кислорода до воды. Экспрессия оперона *суоАВСD*, кодирующего цитохромоксидазу bo', максимальна при высоком внутриклеточном содержании кислорода, тогда как экспрессия bd-I и bd-II находится на низком уровне [2]. Напротив, в условиях низких внутриклеточных концентраций кислорода, наблюдаемых, в частности, на стационарной стадии роста бактерий, активность bd-I и bd-II резко повышается, а экспрессия bo' существенно снижается [3]. Наряду с опероном *суdAB*, для сборки активной bd-Iоксидазы необходимо функционирование еще двух генов – *cydDC*, контролирующих синтез гетеродимерного АТР-связывающего транспортера [4, 5].

Помимо генерации протон-движущей силы, цитохромоксидаза *bd*-I выполняет в клетке и другие жизненно важные функции. Так, активная bd-I повышает толерантность E. coli к оксилу азота [6, 7], окислительному стрессу [8, 9] и вовлечена в механизм детоксификации клеток E. coli от пероксида водорода [10, 11]. Уровень экспрессии и содержание цитохромоксидазы bd-I в мембране увеличиваются не только при низкой концентрации О₂ [12-14], но и в условиях защелачивания среды [15], при высокой температуре [16, 17], при добавлении в среду ядов, в частности цианида [18, 19], в присутствии разобщителей протонофоров [15, 20, 21] и при высоком гидростатическом давлении [22, 23]. Мутанты E. coli, дефектные по bd-I, обнаруживают чувствительность к H₂O₂[17], цинку [18, 24], продуцируют внеклеточный фактор, ингибирующий рост бактерий [25, 26], а также теряют способность выходить из стационарной фазы роста и возобновлять аэробный рост при 37°С [27, 28]. В то же время, какие-либо данные об участии цитохромоксидазы bd-I в защите бактерий от действия антибиотиков отсутствуют.

Главной задачей настоящей работы было выяснение роли цитохромоксидазы *bd*-I в обеспечении устойчивости бактерий к действию антибиотиков. С этой целью мы инактивировали цито-

| Штамм | Генотип | Происхождение |
|--------|-----------------------------------------------|---------------|
| MG1655 | F ⁻ дикий тип | [29] |
| AM3105 | Как MG1655, но <i>∆суdВ</i> | [30] |
| AM3086 | Как MG1655, но <i>∆суdD</i> | [30] |
| AM3096 | Как MG1655, но P _{tet} - <i>katG</i> | [30] |
| AM3009 | Как MG1655, но P _{tet} - <i>mstA</i> | [31] |
| AM3111 | Как АМ3086, но Р _{tet} - <i>katG</i> | Данная работа |
| AM3113 | Как AM3105, но P _{tet} - <i>katG</i> | » |
| AM3114 | Как AM3086, но P _{tet} - <i>mstA</i> | » |
| AM3115 | Как AM3105, но P _{tet} - <i>mstA</i> | » |
| AM3120 | Как MG1655, но pSoxS':: <i>lux</i> | » |
| AM3122 | Как AM3105, но pSoxS':: <i>lux</i> | » |
| AM3123 | Как АМ3086, но pSoxS':: <i>lux</i> | » |

Таблица 1. Генотип и происхождение штаммов E. coli, использованных в работе

хромоксидазу bd-I путем делеции генов cydB или cydD в хромосоме E. coli и показали, что полученные мутантные бактерии сверхчувствительны к действию хинолоновых и бета-лактамных антибиотиков. Таким образом, данные, показывающие, что повышенная чувствительность мутантов $\Delta cvdB$ и $\Delta cvdD$ к антибиотикам супрессируется при конститутивной экспрессии гена katG или высоком уровне генерации сероводорода, позволяют заключить, что шитохромоксидаза bd-I вовлечена в защиту бактерий от действия бактеринилных антибиотиков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы. Использованные в работе бактериальные штаммы E. coli и их генотип представлены в табл. 1. Делеционные мутанты получали, выращивая фаг Р1 на штаммах из коллекции Keio [32], содержащих инсерции cysB::kan и cydD::kan, и их последующей трансдукции в геном штамма E. coli MG1655. Из полученных штаммов удаляли канамициновую кассету с помощью хелперной плазмиды рСР20 [33] с образованием делеций $\Delta cvdB$ и $\Delta cvdD$. Наличие делеций подтверждали с помощью ПЦР. Получение штаммов, содержащих гены katG и mstA под контролем конститутивного промотора P_{tet}, описано в работе [31]. Для количественной оценки уровня генерации супероксид-аниона использовали гибридную плазмиду pSoxS'::lux, в которой промоторно-операторная область перед геном soxS транскрипционно слита с кассетой генов luxC-DABE P. luminescens [34, 35].

Среды и условия культивирования. В качестве полноценной питательной среды для выращивания бактерий использовали среду LB без глюкозы [36]. В жидкой среде бактерии культивировали на качалке (200 об./мин). При необходимости в среду добавляли: налидиксовую кислоту (2 мкг/мл), норфлоксацин (0.05 мкг/мл), моксифлоксацин (0.05 мкг/мл), карбенициллин (3 мкг/мл), ампициллин (3 мкг/мл).

Построение кривых роста бактерий. Кривые роста строили с использованием автоматического прибора Bioscreen. Ночные культуры бактерий, выращенные при 37°С в среде LB, разводили в 100 раз, помещали в лунки платформы Bioscreen и растили при 37°С и максимальном встряхивании. Величины ОД₆₀₀ записывали автоматически через определенные промежутки времени. Каждый опыт проводили в трех повторностях. средние значения использовали для построения кривых роста бактерий.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам. Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°С до титра 107, обрабатывали указанными концентрациями антибиотиков и продолжали выращивать в течение 90 мин. затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°С, 24 ч). Выживаемость определяли, подсчитывая число колоний в трех независимых опытах и вычисляя средние значения. Кроме того, способность к образованию колоний оценивали методом микроразведений. Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и подращивали на термостатированной качалке при 37° C до $OD_{600} =$ = 0.5-0.6. Все суспензии выравнивали по оптической плотности. Готовили серию десятикратных разведений полученных культур в 96-луночном планшете в объеме 100 мкл. Полученные разведения высевали на чашки с богатой средой, содержашей различные концентрации исследуемых антибиотиков. Чашки инкубировали в течение ночи в

620



Рис. 1. Мутанты *суdВ* и *суdD* характеризуются увеличением продолжительности лаг-фазы роста. Показаны кривые роста штаммов MG1655 (дикий тип) и мутантов *суdB* и *суdD*. Ночные культуры бактерий, выращенные при 37° C в среде LB, разводили в 100 раз, помещали в лунки платформы прибора Bioscreen C и растили при 37° C и максимальном встряхивании. Величины *OD*₆₀₀ записывали автоматически через определенные промежутки времени. Каждый опыт проводили в трех повторностях, для построения кривых роста бактерий использовали средние значения.

термостате при 37°С и фотографировали с помощью аналитической системы GelCamera M-26XV.

Определение уровня генерации активных форм кислорода в присутствии антибиотиков. Ночные культуры бактерий, содержащие плазмиду pSoxS'::lux, разводили до титра 10⁷ клеток/мл в свежей среде LB и выращивали с аэрацией при 30°С до ранней экспоненциальной стадии. Пробы объемом 200 мкл переносили в специальные кюветы, одна из проб, в которую добавляли 4 мл дистиллированной воды, служила контролем, а во вторую добавляли антибиотики с заданной концентрацией. Пробы помещали перед фотоумножителем люминометра LMAO1 ("Весктапп", США) для измерения интенсивности биолюминесценции. Интенсивность биолюминесценции определяли согласно [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инактивация цитохромоксидазы bd-I приводит к сверхчувствительности к антибиотикам

Согласно многочисленным исследованиям, генетическое повреждение цитохромоксидазы *bd*-I снижает устойчивость бактерий к окислительному и другим видам физиологического стресса [6–11]. Для проверки возможного участия этого ферментного комплекса в защите бактерий от бактерицидных антибиотиков проведена инактивация *bd*-I путем трансдукционного переноса инсерций *cydB::kan* и *cydD::kan* из штаммов коллекции Кеіо [32] в хромосому штамма MG1655 с последующим выщеплением канамициновой кассеты и образованием соответствующих делеций $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$. Ген *суdB* кодирует субъединицу II цито-хромоксидазы *bd*-I, которая: в комплексе с субъединицей I образует активный фермент, способный связывать металлсодержащие кофакторы: гем b558, гем b595 и гем d [38]. Ген *суdD* кодирует транспортер типа ABC, содержащий сайт связывания ATP, и участвует в сборке активного комплекса *bd*-I [39].

Построение кривых роста мутантных клеток (рис. 1) показало, что у обоих мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ продолжительность лаг-фазы значительно увеличивается по сравнению с родительским штаммом MG1655, однако по достижении экспоненциальной стадии скорости роста мутантов и бактерий дикого типа, выравниваются.

На следующем этапе работы определяли чувствительность полученных мутантов к антибиотикам, принадлежащим к классу хинолонов – налидиксовой кислоте, норфлоксацину и моксифлоксацину, а также к бета-лактамам – ампициллину и карбенициллину (рис. 2 и 3). Как показано на рис. 2 и 3, оба мутанта ($\Delta cydB$ и $\Delta cydD$) обнаруживают значительно более высокий уровень чувствительности ко всем трем хинолонам, а также к бета-лактамам по сравнению с родительским штаммом MG1655.



Рис. 2. Конститутивная экспрессия гена *katG* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию хинолоновых антибиотиков: налидиксовой кислоте (Nal), норфлоксацину (Nor) и моксифлоксацину (Mox). $a - Эф-фективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB-средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях; <math>\delta -$ ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин. Затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Здесь и на рис. 3–5 выживаемость определяли, подсчитывая число колоний в трех независимых опытах для вычисления средних значений.



Рис. 3. Конститутивная экспрессия гена *katG* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию бета-лактамных антибиотиков: ампициллину (Amp) и карбенициллину (Car). $a - Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB-средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях. <math>\delta$ – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях. δ – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин. Затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Выживаемость определяли как на рис. 2.



Рис. 4. Конститутивная экспрессия гена *mstA* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию хинолоновых антибиотиков: налидиксовой кислоте (Nal), норфлоксацину (Nor) и моксифлоксацину (Mox). *a* – Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB- средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях. *б* – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин, затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Выживаемость определяли, как на рис. 2.

Сверхчувствительность мутантов ∆суdВ и ∆суdD частично супрессируется конститутивным синтезом каталазы KatG и высоким уровнем генерации сероводорода

Хинолоны ингибируют ДНК-гиразу грамотрицательных бактерий, один из ключевых ферментов, участвующих в репликации бактериальной хромосомы, на стадии формирования эфирной связи тирозилфосфата, в результате чего в основной цепи ДНК образуется разрыв. Этот этап бактериостатичен и обратим. Бактерицидное (летальное) необратимое действие хинолонов связано с последующим процессом накопления одно- и двухцепочечных разрывов в ДНК [40], оно определяется сложным взаимодействием хинолона и гидроксил-радикала ОН' [41-43]. Гидроксил-радикал играет ключевую роль и в летальном эффекте антибиотиков других групп (β-лактамных, аминогликозидных и др.) [44–49]. При росте необработанных хинолонами бактерий в аэробных условиях активные формы кислорода (АФК) образуются как побочный продукт активности ферментов дыхательной системы. Однако системы защиты от пероксида водорода (каталазы KatG и KatE, алкилгидропероксидредуктаза АhpC) и супероксид-аниона

(супероксиддисмутазы MnSodA, FeSodB, CuSodC) обеспечивают очень низкий базальный уровень АФК, не способный повредить ДНК, тем более что клетка содержит специальные ферменты, репарирующие окисленные азотистые основания в ДНК.

Обнаруженная нами сверхчувствительность мутантов $\Delta cvdB$ и $\Delta cvdD$ к антибиотикам указывает на критическую роль цитохромоксидазы bd-I в защите клетки от предполагаемого повышенного уровня генерации АФК при обработке бактерий антибиотиками. Для проверки этого предположения мы решили усилить экспрессию гена katG, кодирующего каталазу, - один из основных ферментов, обеспечивающих защиту клеток от действия АФК. С этой целью ген katG поместили под контроль сильного промотора P_{tet.} и полученную конструкцию перенесли в геном мутантов $\Delta cydB$ и Δcvd . Как следует из рис. 2 и 3. конститутивная экспрессия katG приводит к существенной супрессии бактерицидного действия антибиотиков на мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$. Обращает на себя внимание тот факт, что сверхэкспрессия каталазы более эффективно супрессирует чувствительность к антибиотикам на фоне делеции $\Delta cvdD$, чем при повреждении гена *суdB*.



Рис. 5. Конститутивная экспрессия гена *mstA* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию бета-лактамных антибиотиков: ампициллину (Amp) и карбенициллину (Car). $a - Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB-средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях. <math>\delta$ – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°С до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин, затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°С, 24 ч). Выживаемость определяли, как на рис. 2.

Аналогичный уровень супрессии наблюдается при внесении в хромосому гена mstA под контролем сильного промотора P_{tet}, что обеспечивает высокий уровень генерации внутриклеточного сероводорода (рис. 4 и 5). Ранее мы показали, что ген *mstA*, кодирующий 3-меркаптопируват-сульфидтрансферазу, играет ключевую роль в генерации эндогенного сероводорода и в условиях конститутивного синтеза обеспечивает защиту бактерий от окислительного стресса и антибиотиков [29, 31]. Главным механизмом защитного действия сероводорода является его способность титровать молекулы свободного железа в реакции Фентона, приводящей к генерации токсичного гидроксил-радикала [31]. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что важной составляющей бактерицидного действия используемых антибиотиков является генерация АФК.

Мутанты ∆суdВ и ∆суdD характеризуются более высоким базальным уровнем генерации АФК

Уровень генерации АФК определяли с использованием плазмиды SoxS'::*lux* – специфического индуцируемого *lux*-биосенсора, позволяющего детектировать супероксид-анион [34]. Этой плазмидой трансформировали клетки мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ и измеряли интенсивность биолюминесценции полученных штаммов в зависимости от времени инкубации (рис. 6). Как следует из данных, представленных на рис. 6, мутанты $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ характеризуются резким нарастанием интенсивности биолюминесценции по сравнению с бактериями дикого типа. Из этого следует, что повреждение цитохромоксидазы *bd*-I действительно сопровождается более высоким базальным уровнем генерации супероксидного аниона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Бактериальная клетка содержит ферменты, осуществляющие защиту от АФК: каталазы (KatG и KatE) и алкилгидропероксидредуктаза AhpC разлагают пероксид водорода до сверхнизких концентраций, а супероксиддисмутазы SodA, SodB и SodC восстанавливают супероксид-анионы до кислорода и пероксида водорода, который в дальнейшем разлагается каталазами. Показано, что основной вклад в летальное действие пероксида водорода вносят присутствующие в клетке свободные ионы Fe²⁺ [50, 51]. В этом случае пероксид водорода



Рис. 6. Мутанты *cydB* и *cydD* обнаруживают повышенный уровень генерации супероксидного аниона по сравнению с бактериями дикого типа. Показана интенсивность люминесценции, обеспечиваемой плазмидой pSoxS'::lux, в клетках мутантов *cydB* и *cydD*, и штамма MG1655 дикого типа.

в реакции с ионом железа (реакция Фентона) превращается в гидроксил-радикал OH:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$$
.

Радикал OH характеризуется высокой стабильностью и способностью вызывать разрывы в цепи ДНК. Полученные нами данные позволяют заключить, что цитохромоксидаза bd-I, наряду с описанными выше ферментами, играет важную роль в защите клеток бактерий от окислительного стресса и бактерицидного действия антибиотиков. Кроме того, наши данные подтверждают концепцию о важном вкладе АФК в летальное действие бактерицидных антибиотиков на бактериальные клетки [41–48, 52]. Результаты нашей работы показывают, что цитохромоксидазу bd-I можно рассматривать как перспективную мишень для создания ингибиторов, обладающих антибактериальной активностью.

Авторы выражают благодарность Е.А. Нудлеру за ценные комментарии при обсуждении результатов настоящей работы.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF-193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Anraku Y., Gennis R.B. (1987) The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem*. *Sci.* **12**, 262–266.
- Kranz R.G., Gennis R.B. (1983) Immunological characterization of the cytochrome o terminal oxidase from *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* 258, 10614–10621.
- 3. Rice C.W., Hempfling W.P. (1978) Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **134**, 115–124.
- 4. Georgiou C.D., Fang H., Gennis R.B. (1987) Identification of the *cydC* locus required for the expression of the functional form of the cytochrome *d* terminal oxidase complex in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **169**, 2107–2112.
- Poole R.K., Hatch L., Cleeter M.W.J., Gibson F., Cox G.B., Wu G. (1993) Cytochrome bd biosynthesis in *Escherichia coli*: the sequences of the cydC and cydD genes suggest that they encode the components of an ABC membrane transporter. *Mol. Microbiol.* 10, 421– 430.
- 6. Borisov V.B., Forte E., Konstantinov A.A., Poole R.K., Sarti P., Giuffre A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide. *FEBS Lett.* **576**, 201–204.
- Mason M.G., Shepherd M., Nicholls P., Dobbin P.S., Dodsworth K.S., Poole R.K., Cooper C.E. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli. Nat. Chem. Biol.* 5, 94–96.
- Lindqvist A., Membrillo-Hernandez J., Poole R.K., Cook G.M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress. *Antonie Van Leuwenhoek*. **78**, 23–31.
- 9. Giuffre A., Borisov V.B., Arese M., Sarti P., Forte E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance

to oxidative and nitrosative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1837**, 1178–1187.

- Борисов В.Б., Давлетшин А.И., Константинов А.А. (2010) Пероксидазная активность цитохрома bd из Escherichia coli. Биохимия. 75, 520–530.
- Korshunov S., Imlay J.A. (2010) Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **75**, 1389–1401.
- 12. Rice C.W., Hempfling W.P. (1978) Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **134**, 115–124.
- Cotter P.A., Chepuri V., Gennis R.B., Gunsalus R.P. (1990) Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* 172, 6333–6338.
- 14. Fu H.-A., Iuchi S., Lin E.C.C. (1991) The requirement of ArcA and Fnr for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 209–213.
- 15. Avetisyan A.V., Bogachev A.V., Murtasina R.A., Skulachev V.P. (1992) Involvement of a *d*-type oxidase in the Na⁺-motive respiratory chain of *Escherichia coli* growing under low $\Delta\mu$ H⁺ conditions. *FEBS Lett.* **306**, 199–202.
- Delaney J.M., Fayet O., Lipinska B., Yamamoto T., Georgopoulos C. (1992) *arc*-Dependent thermal regulation and extragenic suppression of the *Escherichia coli* cytochrome *d* operon. *J. Bacteriol.* **174**, 6554–6562.
- Delaney J.M., Wall D., Georgopoulos C. (1993) Molecular characterization of the *Escherichia coli htrD* gene: cloning, sequence, regulation, and involvement with cytochrome *d* oxidase. *J. Bacteriol.* **175**, 166–175.
- Ashcroft J.R., Haddock B.A. (1975) Synthesis of alternative membrane-bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochem. J.* 148, 349–352.
- Brekasis D., Paget M.S. (2003) A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 222, 4856–4865.
- Bogachev A.V., Murtazina R.A., Skulachev V.P. (1993) Cytochrome *d* induction in *Escherichia coli* growing under unfavorable conditions. *FEBS Lett.* 336, 75–78.
- 21. Bogachev A.V., Murtazine R.A., Shestopalov A.I., Skulachev V.P. (1995) Induction of the *Escherichia coli* cytochrome *d* by low $\Delta \mu H^+$ and by sodium ions. *Eur. J. Biochem.* **232**, 304–308.
- Tamegai H., Kato C., Horikoshi K. (1998) Pressureregulated respiratory system in barotolerant bacterium, *Shewanella* sp. strain DSS12. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 1, 213–220.
- Tamegai H., Kawano H., Ishii A., Chikuma S., Nakasone K., Kato C. (2005) Pressure-regulated biosynthesis of cytochrome *bd* in piezo- and psychrophilic deepsea bacterium *Shewanella violacea* DSS12. *Extremophiles*. 9, 247–253.
- Poole R.K., Williams H.D., Downie J.A., Gibson F. (1989) Mutations affecting the cytochrome *d*-containing oxidase complex of *Escherichia coli* K12: identification and mapping of a fourth locus, *cydD. J. Gen. Microbiol.* 135, 865–1874.

- 25. Macinga D.R., Rather P.N. (1996) *aarD*, a *Providencia stuartii* homologue of *cydD*: role in 2'-*N*-acetyltransferase expression, cell morphology and growth in the presence of an extracellular factor. *Mol. Microbiol.* **19**, 511–520.
- Cook G.M., Loder C., Soballe B., Stafford G.P., Membrillo-Hernandez J., Poole R.K. (1998) A factor produced by *Escherichia coli* K-12 inhibits the growth of *E. coli* mutants defective in the cytochrome *bd* quinol oxidase complex: enterochelin rediscovered. *Microbiology.* 144, 3297–3308.
- Siegele D.A., Kolter R. (1993) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant defective in resuming growth after starvation. *Genes Dev.* 7, 629–640.
- Siegele D.A., Imlay K.R., Imlay J.A. (1996) The stationary-phase-exit defect of *cydC* (*surB*) mutants is due to the lack of a functional terminal cytochrome oxidase. *J. Bacteriol.* 178, 6091–6096.
- Shatalin K, Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (211) H₂S: A universal defense against antibiotics in bacteria. *Science.* 334, 986–990.
- Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornykh M., Shakulov R., Nudler E. (2020) CydDC functions as a cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 23565–23570.
- Mironov A., Seregina T., Nagornykh M., Luhachack L., Korolkova L, Errais Lopes L, Kotova V., Zavilgelsky G., Shakulov R., Shatalin R., Nudler E. (2017) A mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114, 6022–6027.
- 32. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008.
- Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6640–6645.
- 34. Котова В.Ю., Миронов А.С., Завильгельский Г.Б. (2014) Вклад активных форм кислорода в бактерицидное действие хинолонов – ингибиторов ДНКгиразы. *Молекуляр. биология.* 48(6), 990–998.
- Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. (2009) Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса. Биотехнология. №6, 16–25.
- 36. Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Manukhov I.V. (2007) Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 634, 172–176.
- Kita K., Konishi K., Anraku Y. (1984) Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome b558-d complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electroncarrying systems. *J. Biol. Chem.* 259, 3375–3381.
- 39. Cruz-Ramos H., Cook G.M., Wu G., Cleeter M.W., Poole R.K. (2004). Membrane topology and mutational

626

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 4 2022

analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly. *Microbiology*. **150**, 3415–3427.

- 40. Luan G., Hong Y., Drlica K., Zhao X. (2018) Suppression of reactive oxygen species accumulation accounts for paradoxical bacterial survival at high quinolone concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e01622-17.
- 41. Malik M., Zhoo X., Drlica K. (2006) Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol. Microbiol.* **61**, 810–825.
- Dwyer D.J., Kohanski M.A., Hayele B., Collins J.J. (2007) Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli. Mol. Syst. Biol.* 3, 91–106.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayele B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 130, 797–810.
- Wang X., Zhao X., Malik M., Drlica K. (2010) Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 520–524.
- Dwyer D.J., Kohanski M.A., Collins J.J. (2009) Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 482–489.

- Wang X., Zhao X. (2009) Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1395–1402.
- 47. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435.
- 48. Belenky P., Collins J.J. (2011) Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*. **334**, 915–916.
- 49. Foti J.J., Devadoss B., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. (2012) Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science.* **336**, 315–319.
- 50. Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **240**, 640–642.
- Park S., You X., Imlay J.A. (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx7 mutants of *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 9317–9322.
- 52. Zhao X., Drlica K. (2014) Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **21**, 1–6.

INACTIVATION OF TERMINAL OXIDASE bd-I LEADS TO SUPERSENSITIVITY OF E. coli TO ANTIBIOTICS OF QUINOLONE AND BETA-LACTAM CLASSES

T. A. Seregina^{1, *}, K. V. Lobanov¹, R. S. Shakulov¹, and A. S. Mironov¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia *e-mail: tatyana.s82@gmail.com

In *E. coli* cells terminal oxidase *bd*-I encoding by *cydAB* genes catalyzes the reduction of O_2 to water by using hydroquinone as electron donor. In addition to the *cydAB* operon, the two other genes, *cydC* and *cydD* encoding heterodimeric ATP-binding cassette-type transporter are essential for the assembly of cytochrome *bd*-I. It was shown that inactivation of cytochrome *bd*-I by introduction of *cydB* or *cydD* deletions into *E. coli* chromosome leads to supersensitivity of bacteria to antibiotics of quinolone and beta-lactam classes. The sensitivity of these mutants to antibiotics is partially suppressed by introduction into their genome constitutive expressing *katG* gene under the control of P_{tet} promoter. To the same effect leads increased level of hydrogen sulfide as a result of introduction of *mstA* gene encoding 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase under the control of P_{tet} promoter. The data obtained demonstrate the important role of cytochrome *bd*-I in defence of bacteria from oxidative stress and bactericidal antibiotics.

Ключевые слова: *E. coli*, terminal oxidase *bd*-I, *cydB* и *cydD* deletions, supersensitivity to antibiotics, oxidative stress, catalase KatG, hydrogen sulfide