### \_\_\_\_ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ОТ МЕХАНИЗМОВ РЕПЛИКАЦИИ \_\_\_\_\_\_ И ПАТОГЕНЕЗА К ПОДХОДАМ ТЕРАПИИ

УЛК 575.826

## ПОВЫШЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ЭФФЕКТА АНТИБИОТИКОВ ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ГЕНЕРАЦИЮ СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ

© 2022 г. Т. А. Серегина<sup>а, \*</sup>, К. В. Лобанов<sup>а</sup>, Р. С. Шакулов<sup>а</sup>, А. С. Миронов<sup>а</sup>

 $^a$ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: tatyana.s82@gmail.com Поступила в редакцию 02.03.2022 г. После доработки 28.03.2022 г.

Принята к публикации 28.03.2022 г.

Борьба с возникновением и распространением бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, провоширующих развитие внутрибольничных инфекций, остается актуальной задачей здравоохранения во всем мире. В обзоре рассмотрены результаты недавних исследований, показывающих, что наряду с инактивацией специфических биохимических мишеней, многие антибиотики провоцируют в бактериальных клетках развитие окислительного стресса, который повреждает клеточные макромолекулы и повышает чувствительность бактерий к антибиотикам. Ранее мы установили, что генерация сероводорода (универсального протектора бактерий от окислительного стресса) различными бактериальными патогенами защищает их от бактерицидных антибиотиков. В дальнейшем была выявлена взаимосвязь между генерацией H<sub>2</sub>S, метаболизмом цистеина и окислительным стрессом. Наконец, в наших последних работах показано, что малые молекулы, ингибирующие ферменты, вовлеченные в генерацию сероводорода, существенно повышают бактерицидный эффект антибиотиков различного типа, включая хинолоны, бета-лактамы и аминогликозиды *in vitro*, а также влияют на развитие инфекций в мышиных моделях. Кроме того, отобранные ингибиторы супрессируют толерантность бактерий к антибиотикам, нарушают образование биопленок и существенно снижают количество персистеров, переживающих обработку антибиотиками. Мы предполагаем, что агенты, ограничивающие биосинтез сероводорода, могут быть эффективным инструментом в борьбе с распространением бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью.

**Ключевые слова:** бактерии, антибиотики, окислительный стресс, продукция сероводорода, ингибиторы ферментов биосинтеза сероводорода, антимикробные препараты

**DOI:** 10.31857/S0026898422050123

### **ВВЕДЕНИЕ**

Распространение бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью и внутрибольничные инфекции представляют одну из наиболее серьезных проблем здравоохранения в мире. Пандемия COVID-19 перевела эту проблему из разряда важных в разряд острых. Медленный прогресс в разработке новых противомикробных препаратов и быстрое появление резистентности к новым терапевтическим средствам вызывают серьезную озабоченность и ставят под сомнение эффективность методов лечения бактериальных инфекций [1-3]. Антибиотикорезистентность патогенных бактерий – это фундамент следующей пандемии, которая ждет человечество в обозримом будущем. В настоящее время от бактериальных инфекций, устойчивых к действию антибиотиков, в мире ежегодно умирает приблизительно 700000 человек. При повышении численности

резистентных форм опасных бактериальных инфекций смертность будет исчисляться миллионами жертв. Высокая летальность пациентов с бактериальными инфекциями и экономические потери будут значительно превосходить негативный эффект от пандемии COVID-19. Прогнозируется, что к 2050 году количество смертельных исходов, вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериальными инфекциями, достигнет 10 млн. в год, а потери мировой экономики будут составлять внушительные 100 трлн. долларов США [4].

Устойчивость бактерий к действию антибиотиков, определяемая как наследственно закрепленная способность расти и размножаться в присутствии высокого уровня антибиотиков [3, 5], обеспечивается четырьмя главными механизмами: (1) модификациями мишени антибиотиков в результате мутаций; (2) снижением проницаемости оболочки бактериальной клетки для антибио-

тика; (3) снижением процесса импорта в клетку или увеличением эффективности экспорта антибиотиков из клетки, в результате чего антибиотик не может взаимодействовать с мишенью; (4) ферментативная деградация антибиотика или другие химические модификации, снижающие его сродство к мишени [7–12]. В то же время бактерии способны выживать в присутствии антибиотиков не в результате генетически детерминированной устойчивости, но путем временной остановки роста и снижения уровня метаболизма. Такое состояние называется толерантностью к антибиотикам, или персистенцией. В этих условиях выживает только небольшая часть бактериальной популяции, а выжившие бактерии получили наименование персистеров [13]. Помимо антибиотиков. образование персистеров может индуцироваться другими видами стресса, причем бактериальная популяция спонтанно генерирует небольшое количество персистеров для защиты от потенциальных генотоксических агентов [14].

Проблема толерантности к антибиотикам привлекла особое внимание исследователей в начале 2000, когда показали, что устойчивость бактериальных биопленок к высоким дозам антибиотиков обусловлена присутствием персистеров [15— 19]. Образование биопленок сопровождает большинство инфекционных заболеваний человека, особенно часто это происходит в клинических условиях [13, 20]. Целый ряд хронических заболеваний человека сопровождается генерацией персистеров, борьба с которыми трудна и требует специальных подходов [14, 21-23]. Кроме того, все более очевидной становится роль персистеров как предшественников образования мутантов, устойчивых к антибиотикам [24—27]. Для успешной борьбы с персистерами необходима разработка специфических соединений – потенциаторов – обеспечивающих подавление их формирования в присутствии антибиотиков. В связи с этим особую актуальность приобретают работы, направленные на расшифровку механизмов, ответственных за летальное действие антибиотиков.

Недавние исследования показали, что помимо своей основной активности, многие антибиотики вызывают окислительный стресс, который повреждает клеточные макромолекулы и способствует бактерицилной активности антибиотиков [28-30]. Вовлечение активных форм кислорода (АФК), как нового фактора бактерицидного действия антибиотиков, расширило разработку новых экспериментальных подходов к поиску соединений, обладающих свойствами антиоксидантов, повышающих эффективность антибиотиков. Ранее мы установили, что бактерии производят сероводород (H<sub>2</sub>S), который снижает окислительный стресс и обеспечивает существенную защиту широкого спектра бактериальных патогенов от бактерицидных антибиотиков [31]. Подавление

образования Н<sub>2</sub>S делает бактерии менее устойчивыми к первичному действию антибиотиков, усиливая тем самым их бактерицидную активность [32]. Практически у всех бактерий в продукции H<sub>2</sub>S участвуют ферменты, ортологичные ферментам млекопитающих: цистатионин-ү-лиазы (CSE), цистатионин-β-синтазы (CBS) и 3-меркаптопируватсульфотрансферазы (3МST) [33, 34]. Показано, что у ряда патогенов, включая Staphylococcus aureus и Pseudomonas aeruginosa, генетическое повреждение путей биосинтеза Н<sub>2</sub>S приводит к чувствительности к различным классам антибиотиков и иммунному ответу хозяина [35, 36]. Учитывая эти данные, мы отобрали специфические ингибиторы фермента CSE и показали способность таких ингибиторов усиливать действие бактерицидных антибиотиков на патогенные бактерии S. aureus и *P. aeruginosa*, а также подавлять формирование бактериальных персистеров. Прежде чем перейти к описанию Н<sub>2</sub>S-зависимой системы защиты бактерий от окислительного стресса и бактерицидных антибиотиков, мы более детально рассмотрим взаимосвязь между летальным действием антибиотиков и окислительным стрессом.

### ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ БАКТЕРИЦИДНЫМ ДЕЙСТВИЕМ АНТИБИОТИКОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

Молекулярные мишени основных классов бактерицидных антибиотиков изучены достаточно детально: бета-лактамы интерферируют с биосинтезом клеточной стенки; хинолоны ингибируют ДНК-гиразу грамотрицательных бактерий, одного из ключевых ферментов, участвующих в репликации бактериальной хромосомы на стадии формирования эфирной связи тирозилфосфата, в результате чего в основной цепи ДНК образуется разрыв; аминогликозиды связываются с рецепторами на 30S субъединице бактериальной рибосомы, вызывая ошибки трансляции [37]. Однако на протяжении последних десятилетий накапливались данные, свидетельствующие о том, что летальное действие антибиотиков невозможно объяснить исключительно их взаимодействием с первичными мишенями, оно зависит также от метаболических процессов, сопровождающихся генерацией АФК [38]. В бактериальных клетках обнаружены три типа АФК: супероксид-анион

 $(O_2^-)$ , пероксид водорода  $(H_2O_2)$  и гидроксил-радикал (•OH), которые образуются как побочные продукты активности ферментов дыхательной системы [39]. Бактериальная клетка содержит ферменты, осуществляющие защиту от AФК: супероксиддисмутазы SodA, SodB и SodC восстанавливают супероксид-анион до кислорода и пероксида водорода, который в дальнейшем разлагается каталазами KatG, KatE и алкилгидропероксидазой AhpC с

образованием воды и кислорода [40]. Показано, что летальное действие пероксида водорода связано с присутствием в клетке свободных ионов железа Fe<sup>2+</sup> [41, 42]. В этом случае пероксид водорода в реакции с ионом железа (реакция Фентона) превращается в гидроксил-радикал •ОН:

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

Радикал •OH характеризуется высокой стабильностью и способностью вызывать разрывы в цепи ДНК [43].

Первые указания на взаимосвязь бактерицидного действия антибиотиков и генерации АФК получены в работах, показывающих, что активация регулона *SoxRS* приводит к устойчивости бактерий к разным классам антибиотиков [44—46]. Похожий вывод сделан на основании данных, показавших, что обработка бактерий такими антиоксидантами, как витамин С или глугатион, вызывает повышение минимальной ингибирующей концентрации для антибиотиков классов хинолонов и аминогликозидов [47, 48]. Кроме того, в обработанных антибиотиками бактериальных клетках зафиксировано статистически значимое увеличение уровня АФК по сравнению с контролем [49, 50].

Прямые доказательства существования взаимосвязи между летальным эффектом антибиотиков и генерацией АФК получены в серии работ группы Коллинза. Главное наблюдение состояло в том, что летальное действие антибиотиков норфлоксоцина, ампициллина и канамицина сопровождалось резким всплеском внутриклеточного уровня гидроксил-радикала, определяемого с помощью флуоресцирующего реагента НРГ, тогда как использование пяти бактериостатических антибиотиков не приводило к появлению флуоресцирующего сигнала [30, 51, 52]. Показано, что гибель бактерий под действием бактерицидных антибиотиков снижалась при добавлении хелатора железа (2,2-дипиридила) или гасителя АФК (тиомочевины) [30]. Выяснилось также, что мутанты recA Escherichia coli характеризуются более высокой чувствительностью к антибиотикам, что свидетельствует об участии АФК в повреждении ДНК, которое устраняется с помощью RecA-зависимой системы репарации. Важно подчеркнуть, что АФК не всегда негативно влияют на выживаемость бактерий, например, применение сублетальных доз супероксид-аниона или инактивация супероксиддисмутазы (sodAB) приводили не к увеличению, а, напротив, к снижению летального действия антибиотиков [53-55].

Важная роль  $A\Phi K$  в реализации летального действия антибиотиков подтверждается данными о том, что двойные мутанты  $sodA\ sodB$  обладают большей устойчивостью к антибиотикам, тогда как генетические повреждения каталаз/пероксидаз  $(katG\ katE)$  увеличивают летальный эффект

антибиотиков всех трех классов в 10-100 раз [43]. Интересные выводы сделаны на основании транспозонного мутагенеза генома *E. coli*, проведенного в присутствии антибиотиков. Оказалось, что две трети транспозонных инсерций локализовались в генах, ответственных за перенос электронов, окислительное фосфорилирование или вовлеченных в образование железо-серных кластеров [56]. Все эти мутанты характеризуются снижением пула ферментов, вовлеченных в дыхание, потребление NADH или электронно-транспортную цепь, т.е. в процессы, которые должны снижать генерацию АФК [56]. Примечательно, что анализ чувствительности Кеіо коллекции E. coli [57] к 22 антибиотикам выявил повышенную чувствительность к бактерицилным антибиотикам у мутантов, содержащих инсерции в локусах recA, recB или recC[58]. Из этого следует, что индуцируемые АФК двухцепочечные разрывы в ДНК являются одним из факторов летального действия антибиотиков [59].

Следует подчеркнуть, что некоторые изменения в метаболизме бактерий, обусловленные действием бактерицидных антибиотиков, никак не связаны с функционированием их первичных мишеней. Например, неожиданно оказалось, что обработка бактерий S. aureus ДНК-повреждающим агентом ципрофлоксацином приводит к окислению жиров и гуанинового основания в ДНК с образованием 8-охо-dGTP [60]. Кроме того, обнаружена супрессия агрегации белков под действием канамицина в условиях суперпродукции пероксиредоксина АһрҒ [61] или супрессия опосредованного ампициллином и канамицином летального эффекта в условиях сверхэкспрессии ферментов MutT и RibA, вовлеченных в удаление 8-oxo-dGTP — токсичного продукта окисления пула GTP под действием AФК [59].

Таким образом, совокупность данных о роли АФК в действии бактерицидных антибиотиков позволяет заключить, что низкие концентрации АФК могут быть полезными и запускать защитные системы клетки, тогда как высокие концентрации, как правило, приводят к летальному эффекту. В связи с этим возникает вопрос, каким образом бактериальная клетка распознает эти две альтернативные ситуации и как передается сигнал от первичного фактора, вызывающего стресс, к системе, генерирующей АФК? Одну из таких систем представляет пара токсин/антитоксин MazF/MazE. В условиях, когда бактериальная клетка подвергается стрессу, происходит деградация белка-антитоксина МаzЕ и тем самым высвобождается белок-токсин MazF. Под действием белка Маг происходит деградация клеточных мРНК [62, 63]. Некоторые из этих РНК транслируются с образованием укороченных неправильно свернутых пептидов, которые включаются в клеточную мембрану и активируют расположен-

ную в оболочке регуляторную систему Срх [64-66]. Активация Срх индуцирует экспрессию белка YihE [67], кодирующего протеинкиназу, которая вовлечена в негативную регуляцию MazF [64]. Белок Срх индуцирует и другие системы, участвующие в ренатурации или деградации неправильно свернутых белков, т.е. выполняет защитную функцию в клетке [68]. Однако оказалось, что делеция гена CpxR, кодирующего регулятор системы Срх, приводит к защите клеток от летального действия хинолонов, бета-лактамов и аминогликозидов [64, 65]. Таким образом, система Срх дикого типа выполняет и деструктивные функции, обусловленные, возможно, активацией двухкомпонентной системы Arc, вовлеченной в контроль редокс-баланса клетки [65, 66]. Система Агс участвует в регуляции активности компонентов системы транспорта, в частности, цитохромоксидазы bd-I [66] и тем самым может регулировать внутриклеточное содержание АФК.

Таким образом, при умеренном и непродолжительном окислительном стрессе бактериальная клетка способна преобразовать образующиеся АФК и защититься от их токсичного и летального действия. Однако при возрастании количества АФК в клетке и увеличении времени экспозиции происходит Срх-зависимое изменение активности Arc-системы, приводящее к увеличению содержания АФК до уровня, превышающего его позитивное действие на клетку, что, в конечном счете, может привести к летальному эффекту. Таким образом, бактериальная клетка располагает несколькими регуляторными системами, с помощью которых АФК могут обеспечивать различные сценарии действия антибиотиков на бактерии.

Ярким примером, показывающим важную роль окислительного стресса в летальном действии антибиотиков, служит обнаруженный нами феномен протективной функции сероводорода в отношении широкого спектра антибиотиков.

### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ГЕНЕРАЦИИ СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ

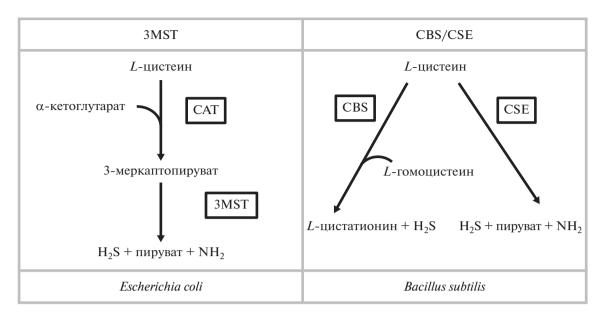
На протяжении многих десятилетий сероводород ( $H_2S$ ) был известен как высокотоксичный яд, подавляющий дыхание организмов благодаря способности эффективно восстанавливать и инактивировать терминальные цитохромоксидазы и другие металлсодержащие ферменты. Способность бактерий продуцировать  $H_2S$  как побочный продукт метаболизма серы была обнаружена почти век назад [69], однако изучение его функций в бактериальной клетке началось лишь недавно. Наряду с оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (CO),  $H_2S$  относится к группе так называемых газов-трансмиттеров, выполняющих (в низ-

ких концентрациях) важную сигнальную роль в клеточном метаболизме эукариот [70]. Первым газом-трансмиттером, выявленным у бактерий, был оксид азота, синтез которого контролируется синтазой оксида азота (bNOS) [71, 72]. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей бактериальных геномов выявил потенциальные аналоги bNOS у ограниченного количества видов грамположительных бактерий [73]. Эти данные послужили поводом к поиску бактериальных ортологов ферментов, генерирующих H<sub>2</sub>S, у млекопитающих: цистатионин-β-синтазы (CBS,  $[K\Phi 4.2.1.22]$ ), цистатионин-у-лиазы (CSE,  $[K\Phi$ 4.4.1.1]), 3-меркаптопируват-сульфотрансферазы (3MST [KФ 2.8.1.2]). В отличие от bNOS, ферменты, катализирующие синтез Н<sub>2</sub>S (т.е. ферменты, участвующие в биосинтезе сероводорода), очень консервативны – у большинства проанализированных видов бактерий обнаружен хотя бы один из гомологов ферментов млекопитающих, что указывает на важную роль сероводорода в жизнедеятельности бактерий [31].

Задолго до того, как обнаружили ферменты, катализирующие эндогенный синтез  $H_2S$ , было известно, что у анаэробных сульфат-продуцирующих бактерий сероводород может генерироваться в метаболическом пути восстановления сульфата [74]. Некоторые кишечные бактерии могут сходным образом продуцировать  $H_2S$  путем восстановления тиосульфата [75].

Как уже отмечено выше, бактерии содержат три фермента, вовлеченных в генерацию  $H_2S$ : CBS, CSE и (3MST) (рис. 1).

Все три фермента используют цистеин в качестве субстрата для синтеза Н<sub>2</sub>S, причем система CBS/CSE может также метаболизировать гомоцистеин в серии реакций, приводящих к образованию H<sub>2</sub>S и других соединений [74, 76]. CBS и CSE являются пиридоксальфосфатзависимыми ферментами. Для протекания 3MST-зависимой реакции необходим предварительный этап, контролируемый аспартат-аминотрансферазой, обладающей цистеин-аминотрансферазной активностью, с образованием сульфана, который затем образует H<sub>2</sub>S в присутствии восстановителей [77, 78]. Эти ферменты найдены в клетках по крайней мере четырех разных бактериальных патогенов. Бактерии Bacillus anthracis, P. aeruginosa и S. aureus кодируют ферменты CBS/CSE, тогда как  $E.\ coli$ содержит 3MST [31]. Известны и другие белки, потенциально способные генерировать H<sub>2</sub>S, например, цистеиндесульфуразы, однако их вклад в генерацию сероводорода не доказан. До недавнего времени был известен только один путь генерации  $H_2S$  в клетках E. coli с участием фермента 3MST [31], однако сравнительно недавно в геноме E. coli и Salmonella enterica идентифицирован оперон суиРА, контролирующий анаэробную де-



**Рис. 1.** Два пути генерации  $H_2S$  у модельных организмов. В клетках *E. coli* цистеин сначала превращается в 3-меркаптопируват с участием цистеин-аминотрансферазы (CAT) с последующим образованием  $H_2S$ , пирувата и аммония под контролем 3-меркаптопируват-сульфотрансферазы (3MST). В клетках *Bacillus subtilis* реализуются два пути генерации  $H_2S-c$  участием цистатионин- $\beta$ -синтазы (CBS) и цистатионин- $\gamma$ -лиазы (CSE).

градацию цистеина до сероводорода [79]. Физиологическая роль этих ферментов состоит в поддержании внутриклеточного содержания цистеина на уровне, который не позволяет реализоваться ингибирующему эффекту цистеина на экспрессию ряда аминокислотных оперонов.

### СЕРОВОДОРОД ЗАЩИЩАЕТ БАКТЕРИИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЦИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Показано, что в организмах млекопитающих H<sub>2</sub>S выполняет функцию кардиопротектора, контролирует расслабление сосудов и гладкой мускулатуры, вовлечен в нейромодуляцию и защиту нейронов от окислительного стресса, а также оказывает противовоспалительное действие при инфекциях желудочно-кишечного тракта [80, 81]. Впервые защитная роль сероводорода в отношении действия бактерицидных антибиотиков была показана нами более 10 лет назад [31]. Оказалось, что инактивация генов, ответственных за генерацию  $H_2S$  у разных патогенных бактерий, приводит к увеличению чувствительности бактерий к широкому спектру антибиотиков. Согласно нашим ранним исследованиям, оксид азота (NO) проявляет сходную защитную активность в отношении антибиотиков у грамположительных бактерий, содержащих bNOS [82]. Поэтому первое предположение о возможной сигнальной функции H<sub>2</sub>S у бактерий было основано на наших работах, посвященных изучению сигнальных функций NO. Хорошо известно, что NO участвует в различных жизненно важных процессах в бактериальной клетке, включая устойчивость к разнообразным стрессам, вирулентность, модуляцию хозяйского ответа на стресс и клеточную коммуникацию [72, 73, 82-87]. В 2009 г. впервые показали, что у тех видов бактерий, которые содержат bNOS, оксид азота защищает бактерии от широкого спектра антимикробных препаратов [82]. Интересно, что NO, выделяемый бактериями B. subtilis и B. anthracis, защищает также от токсина пиоцианина, секретируемого *P. aeruginosa* [82]. Весьма вероятно, что использование газов-трансмиттеров NO и Н<sub>2</sub>S является универсальной стратегией, которую бактерии применяют для защиты от генотоксичных агентов. Действительно, мы обнаружили, что нарушение способности бактерий продуцировать  $H_2S$  в результате инактивации генов *cbs*, *cse* или mstA приводит к резкому увеличению чувствительности таких мутантов к широкому спектру антибиотиков [31]. Добавление экзогенного источника Н<sub>2</sub>S в ростовую среду восстанавливало устойчивость таких мутантов к антибиотикам до уровня штамма дикого типа. Важно отметить, что из всех использованных нами мутантов, дефектных по продукции  $H_2S$ , только штамм B. anthracis содержал активную синтазу оксида азота bNOS, однако попытки объединить в одном геноме муташии cbs/cse и  $\Delta nos$  оказались безуспешными. т.е. комбинация мутаций, нарушающих генерацию обоих газов, приводит к летальному эффекту [31]. В то же время, химическое ингибирование активности bNOS в мутантах, дефектных по cbs/cse, приводило к существенно большей чувствительности таких бактерий к антибиотикам по сравнению с одиночными мутантами cbs/cse и  $\Delta nos$ . На основании этих данных сделано заключение, что у бактерий, имеющих обе системы генерации NO и  $H_2S$ , наблюдается синергичное действие этих газов как протекторов от антибиотиков.

Важное наблюдение, указывающее на реализацию защитного действия H<sub>2</sub>S на уровне супрессии окислительного стресса, сделано на основании определения частоты индуцированных пероксидом водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) двухцепочечных разрывов в хромосомной ДНК мутантов  $\Delta mstA$  с нарушенной продукцией Н<sub>2</sub>S и мутантов со сверхэкспрессией гена mstA, находящегося под контролем промотора Р<sub>tet</sub>. Оказалось, что увеличение уровня генерации  $H_2^{\rm S}$  в мутанте  $P_{\it tet}$ -mstA или добавление экзогенного Н<sub>2</sub>S существенно снижает количество двухцепочечных разрывов в ДНК при обработке клеток  $H_2O_2$  [88]. Эти данные позволяют предположить, что протективное действие Н<sub>2</sub>S осуществляется за счет снижения эффективности реакции Фентона, приводящей к генерации токсичного гидроксил-радикала [89, 90]. Для проверки этого предположения мы внесли в геном мутантов, содержащих делецию  $\Delta mstA$ , дополнительную мутацию в гене *fur*, продукт которого является регулятором ферментов, ответственных за усвоение железа в бактериальных клетках [91, 92]. Известно, что инактивация гена *fur* приводит к 8-кратному увеличению концентрации свободного железа в клетках E. coli и резко увеличивает чувствительность ДНК к окислительному стрессу [93–95]. Оказалось, что в клетках штамма дикого типа инактивация гена *fur* приводит к 40-кратному увеличению чувствительности к  $H_2O_2$ , тогда как выживаемость клеток штамма с делецией гена mstA снижается более чем в 300 раз. В клетках мутанта  $P_{tet}$ -mstA инактивация гена fur практически не сказывается на выживаемости бактерий, обработанных Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [88]. Полученные результаты позволяют заключить, что  $H_2S$ , синтезируемый эндогенно под контролем гена mstA, защищает клетки от бактерицидного действия Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> Совокупность полученных данных показывает, что защитная функция H<sub>2</sub>S, генерируемого под контролем гена *mstA*, наиболее ярко проявляется на фоне делеции гена  $\Delta fur$ , т.е. в условиях высокого внутриклеточного содержания свободного железа. Поэтому можно предположить, что, будучи мощным восстановителем, H<sub>2</sub>S связывает свободное внутриклеточное железо, служащее субстратом реакции Фентона, ведущей к образованию гидроксил-радикала [88].

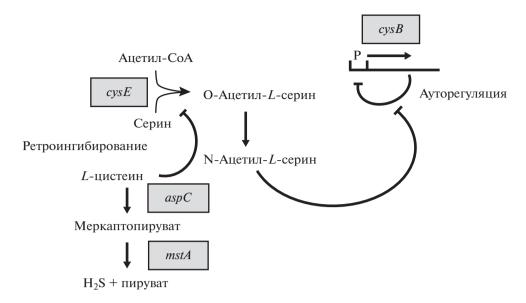
Это заключение подтвердилось последующими экспериментами с мутантами  $E.\ coli$ , содержа-

щими модификации в генах, ответственных за метаболизм и транспорт цистеина.

# ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНЕРАЦИЕЙ СЕРОВОДОРОДА, МЕТАБОЛИЗМОМ ЦИСТЕИНА И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

Высокий уровень устойчивости к окислительному стрессу, наблюдаемый у мутанта  $P_{tet}$ -mstA, может быть обусловлен не только связыванием свободного железа в реакции Фентона, но и усилением леградации L-цистеина. Показано, что L-цистеин может промотировать реакцию Фентона путем восстановления трехвалентного железа (Fe<sup>3+</sup>) в двухвалентное [96]. Можно предположить, что в условиях интенсивной деградации L-цистеина в  $H_2S$  через последовательное действие ферментов АspC и 3MST, наблюдаемой у мутанта  $P_{tet}$ -mstA, реакция Фентона должна подвергаться дополнительной репрессии. Мы предположили, что усиленная деградация L-цистеина в мутанте  $P_{tet}$ -mstA должна активировать экспрессию CysB-регулона. Белок CysB служит сенсором и регулятором внутриклеточного содержания L-цистеина и серы (рис. 2) [97].

Чтобы выявить взаимосвязь между генерацией  $H_2S$  и деградацией L-цистеина мы определили уровень транскрипции генов cysK, cysP и tau, регулируемых белком CysB в штаммах  $\Delta mstA$  и  $P_{tet}$ mstA, методом количественной ПЦР в реальном времени. Выяснилось, что уровень транскрипции генов cysB, cysK, cysP и tau у мутанта  $\Delta mstA$  несколько ниже, чем в штамме дикого типа. Напротив, у мутанта  $P_{tet}$ -mstA транскрипция генов cysK, cysP и tau значительно увеличена — в 10.5, 8.2, и 4.8 раза соответственно. Повышенная экспрессия этих генов, скорее всего, обусловлена 2-кратным увеличением экспрессии гена суѕВ, так как инактивация этого гена снижает уровень их экспрессии до базального уровня. Из этого следует, что индукция генов CysB-регулона обусловлена усиленной деградацией L-цистеина в клетках мутанта  $P_{tet}$ -mstA. Известно, что L-цистеин участвует в аллостерическом ингибировании серин-ацетилтрансферазы (ген cysE), продуктом которой является О-ацетилсерин (ОАЅ), который, в свою очередь. превращается в N-ацетилсерин, служащий автоиндуктором транскрипционного регулятора — белка СуѕВ [98]. Поэтому именно увеличенный пул ОАЅ, вероятнее всего, является главной причиной усиления экспрессии CysB-регулируемых генов у мутанта  $P_{tet}$ -mstA, в то время как сниженный уровень транскрипции этих генов у мутанта  $\Delta mstA$  обусловлен нарушением aspC-mstA-зависимого пути деградации L-цистеина (рис. 2). В соответствии с этим предположением при добавлении экзогенного L-цистеина в среду при выращивании му-



**Рис. 2.** Взаимосвязь между генерацией H<sub>2</sub>S, активностью серин-ацетилтрансферазы и экспрессией гена *суѕВ*. Активность серин-ацетилтрансферазы, кодируемой геном *суѕЕ*, подвержена ретроингибированию цистеином. Продуктом серин-ацетилтрансферазной реакции является О-ацетилсерин, который спонтанно превращается в N-ацетилсерин. N-ацетилсерин служит индуктором транскрипционного регулятора СуѕВ. Белок СуѕВ связывается перед —35 областью позитивно регулируемых промоторов и в присутствии индуктора облегчает формирование комплекса, иниции-рующего транскрипцию. Кроме того, ген *суѕВ* подвержен авторегуляции собственным продуктом, который связывается с собственным промотором в качестве белка-репрессора. N-ацетилсерин стимулирует связывание белка СуѕВ с сайтами, вовлеченными в позитивную регуляцию, но ингибирует связывание с негативно регулируемым промотором гена *суѕВ* [88].

танта P<sub>tet</sub>-mstA экспрессия CysB-регулируемых генов снижается до базального уровня. Кроме того, сравнили уровни транскрипции генов CysB-регулона в условиях окислительного стресса у штамма дикого типа, делеционного мутанта  $\Delta mstA$  и мутанта  $P_{tot}$ -mstA, суперпродуцента  $H_2S$ . В штамме дикого типа мы обнаружили достаточно высокий уровень индукции CysB-регулируемых генов в ответ на обработку пероксидом водорода, что согласуется с опубликованными данными. Следует подчеркнуть, что молекулярный механизм, с помощью которого Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> может влиять на уровень транскрипции CvsB-регулируемых генов, остается нераскрытым. Особый интерес представляют полученные нами результаты, показывающие практически полное отсутствие индукции CysB-зависимых генов под действием  $H_2O_2$  в делеционном мутанте  $\Delta mstA$ .

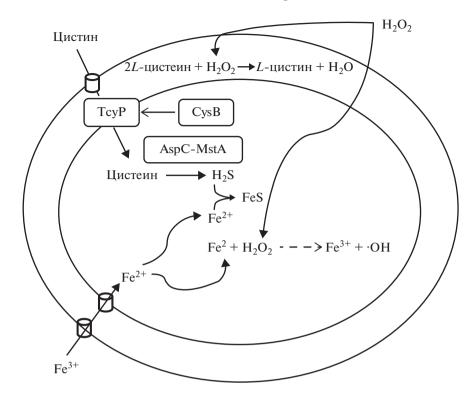
Мы предложили модель, с помощью которой можно объяснить неожиданную роль  $H_2S$  в регуляторном ответе CysB-регулона на окислительный стресс (рис. 3) [88]. Согласно этой модели, экзогенный пероксид водорода, попадая в периплазму клетки, окисляет L-цистеин до L-цистина с образованием воды. Это должно приводить к снижению внутриклеточного пула L-цистеина. Снижение пула L-цистеина, в свою очередь, приводит к снятию авторегуляции транскрипции гена cysB, продукт которого служит активатором генов CysB-регулона и, в частности, гена tcyP, ответственного

за синтез транспортера L-цистина. Усиление потока L-цистина/L-цистеина в клетку обеспечивает усиленную mstA-зависимую генерацию  $H_2S$ , который, связываясь со свободным железом, снижает эффективность реакции Фентона, сопровождающую образование токсичного для клетки гидроксил-радикала ( $\bullet$ OH).

### ФЕРМЕНТЫ, ГЕНЕРИРУЮЩИЕ СЕРОВОДОРОД, КАК МИШЕНИ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Несмотря на потенциальную токсичность в больших дозах, в физиологических концентрациях  $H_2S$  действует как важная сигнальная молекула, которая защищает бактерии от окислительного стресса, иммунной атаки и многих антибиотиков. Эти результаты, поддерживающие концепцию бактерицидного действия антибиотиков через окислительные повреждения, позволили предложить ферменты, продуцирующие  $H_2S$ , в качестве новых многообещающих мишеней для противомикробной терапии. Была поставлена практическая задача синтеза низкомолекулярных соединений, способных служить ингибиторами конкретных ферментов, вовлеченных в генерацию сероводорода.

В качестве модели в этих исследованиях использовали патогенные бактерии: *S. aureus* (грам-



**Рис. 3.** Модель опосредованной  $H_2S$  защиты клеток E. coli от окислительного стресса. Фракция экзогенного  $H_2O_2$  в периплазме клетки вступает в реакцию с цистеином с образованием цистина и воды. Это приводит к снижению внутриклеточного содержания цистеина с последующим снятием авторегуляции гена cysB и активацией CysB-регулируемых генов, включая tcyP, который контролирует транспорт цистина из периплазмы в цитоплазму. Усиление потока цистина/цистеина в клетку приводит к увеличению уровня mstA-зависимой генерации  $H_2S$ , который секвестрирует свободное железо, блокирует реакцию Фентона и предотвращает образование токсичного гидроксил-радикала [88].

положительная) и P. aeruginosa (грамотрицательная) — основные возбудители-внутрибольничных инфекций. С помощью транспозонного мутагенеза в геноме этих бактерий инактивировали гены cbs и cse, кодирующие ферменты, участвующие в продукции сероводорода, и определили их вклад в генерацию сероводорода [99]. Определили уровень генерации  $H_2S$  полученными мутантами и показали, что главную роль в продукции сероводорода у обоих видов бактерий играет фермент CSE. Кроме того, делеционные мутанты cse обнаруживали значительно более высокую чувствительность к антибиотикам гентамицину, ампициллину и норфлоксацину по сравнению со штаммами дикого типа.

В результате виртуального скрининга (SBVS) среди ~3 млн коммерчески доступных малых молекул отобрали три потенциальных ингибитора фермента CSE: NL1, NL2 и NL3. Эксперименты по сокристаллизации этих ингибиторов с мономерами CSE позволили определить сайты связывания всех трех ингибиторов с ферментом. Определена способность отобранных ингибиторов подавлять активность фермента CSE *in vitro*, а также в живых клетках. Важно подчеркнуть, что отобранные ингибиторы проявляли строгую специ-

фичность к бактериальным CSE, но не подавляли активность CSE млекопитающих, включая человека. Выяснилось, что ингибиторы NL1, NL2 и NL3 подавляют способность бактерий S. aureus и P. aeruginosa генерировать  $H_2S$  и существенным образом увеличивают чувствительность этих бактерий к действию антибиотика гентамицина [99].

На мышиных моделях сепсиса, индуцированного S. aureus, и легочной инфекции, вызванной P. aeruginosa, проверена способность ингибиторов NL1, NL2 и NL3 усиливать действие гентамицина против этих инфекций. Показано, что комбинация антибиотика гентамицина с ингибитором NL1 увеличивает выживаемость зараженных сепсисом мышей и снижает титр бактерий P. aeruginosa при легочной инфекции. Исследована способность отобранных ингибиторов снижать долю персистеров, устойчивых к действию ципрофлоксацина и гентамицина, в популяции бактерий S. aureus и *P. aeruginos*, а также их влияние на формирование биопленок. Показано, что обработка бактерий ингибитором NL1 существенно снижает долю персистеров в популяции бактерий S. aureus и P. aeruginosa, а все три ингибитора подавляют формирование биопленок у бактерий *P. aeruginosa*. Таким образом, можно заключить, что ингибиторы NL1, NL2 и NL3 действуют как высокоактивные антибактериальные препараты, усиливающие токсический эффект традиционных антибиотиков [99].

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Инфекционное заболевание часто может быть неизлечимым, даже если оно вызвано патогеном, чувствительным к антибиотикам. Это главный парадокс хронических инфекций. В большинстве случаев хронические инфекции сопровождаются образованием персистеров и биопленок. Персистеры – это метаболически неактивные, неделящиеся варианты обычных клеток, которые случайным образом или под влиянием стресса образуются в микробных популяциях и обладают высокой толерантностью к антибиотикам (не приобретая при этом резистентности к ним). Персистеры могут быть основной причиной неэффективности терапии хронических инфекционных заболеваний. Периодическое применение высоких доз бактерицидных антибиотиков может приводить к отбору штаммов с повышенным уровнем образования персистеров. Именно это и происходит в процессе лечения хронических инфекций, когда пациент периодически подвергается воздействию высоких доз антибиотиков. Скрининговые нокаутные библиотеки не выявили мутантов, полностью лишенных персистеров, что указывает на "избыточность" механизмов образования "дремлющих" клеток. Такая избыточность затрудняет поиск мишеней для предотвращения образования персистеров. Мы показали, что продукция сероводорода в клетке имеет решающее значение для формирования популяции персистеров. Клетки S. aureus и P. aeruginosa с генетическим нарушением основного пути образования сероводорода образуют в 100 раз меньше персистеров после обработки ципрофлоксацином в концентрации, в 10 раз превышающей минимальную ингибирующую концентрацию (MIC). Ингибитор CSE NL1, впервые предложенный нами для усиления действия бактерицидных антибиотиков, в такой же степени снижал количество персистеров, как и генетическая инактивация сѕеоперона. Персистеры генерируют значительно больше  $H_2S$ , чем обычные клетки, что, вероятно, приводит к контролируемому "самоотравлению" и снижению синтеза АТР. В результате происходит замедление метаболизма и, как следствие, возникает высокая толерантность к антибиотикам. Еще одно удивительное наблюдение связано с пиоцианином, вторичным метаболитом, функционирующим как сигнальная молекула и фактор вирулентности в стационарной культуре P. aeruginosa. При инактивации CSE цвет культуры *P. aeruginosa* изменяется от светло-желтого, характерного для восстановленного пиоцианина, до зелено-синего, соответствующего окисленному пиоцианину. Поскольку доля клеток-персистеров у

P. aeruginosa дикого типа может увеличиться в 90 раз в ответ на пиоцианин, отсутствием окислительновосстановительной активности пионианина можно объяснить антиперсистерный эффект ингибирования CSE. Пиоцианин связан с образованием биопленок *P. aeruginosa*. Инактивация CSE приводит к резкому изменению морфологии колоний Р. aeruginosa на чашках с агаром, а также к значительному снижению образования статической биопленки у *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Сравнительный транскриптомный анализ P. aeruginosa показал, что гены, участвующие в формировании биопленок (включая гены биосинтеза альгината и других экзополисахаридов), наиболее сильно подавлены в клетках с дефицитом H<sub>2</sub>S. Обнаружение того, что ингибиторы H<sub>2</sub>S подавляют образование персистеров и биопленок – двух основных адаптаций бактерий к действию антибиотиков, открывает новые возможности для дальнейших испытаний нашего терапевтического подхода с использованием комбинации ингибиторов Н<sub>2</sub>S и антибиотиков, в том числе с применением усовершенствованных новых вариантов ингибиторов  $H_2S$ .

Авторы выражают благодарность Е.А. Нудлеру и А.А. Макарову за ценные замечания при написании и обсуждении настоящего обзора.

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

- Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 29–40.
- 2. Ribeiro da Cunha B., Fonseca L.P., Calado C.R.C. (2019) Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics* (Basel). **8**, 45.
- 3. Schrader S.M., Vaubourgeix J., Nathan C. (2020) Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaaz6992.
- 4. O'Neill J. "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations" (Wellcome Trust, 2016); https://wellcomecollection.org/works/thvwsuba
- Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330.
- 6. Wright G.D. (2011) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem. Commun.* **47**, 4055.

- 7. Lin J., Nishino K., Roberts M.C., Tolmasky M., Aminov R.I., Zhang L. (2015) Mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **6**, 34.
- 8. Webber M., Piddock L. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 9.
- 9. Cox G., Wright G.D. (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 287.
- Piddock L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629.
- 11. Wright G.D. (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 175.
- 12. Walsh C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. **406**, 775–778.
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Nenson T., Van Melderen L., Zinkernagel A. (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 441–448.
- Michiels J.F., Van den Bergh B., Verstraeten N., Michiels J. (2016) Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist. Up*dat. 29, 76–89.
- 15. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**, 1318–1322.
- 16. Kirby A.E., Garner K., Levin B.R. (2012) The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2967–2975.
- Meredith H.R., Srimani J.K., Lee A.J., Lopatkin A.J., You L. (2015) Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. *Nat. Chem. Biol.* 11, 182–188.
- 18. Dewachter L., Fauvart M., Michiels J. (2019) Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance. *Mol. Cell.* **76**, 255–267.
- 19. Schulze A., Mitterer F., Pombo J.P., Schild S. (2021) Biofilms by bacterial human pathogens: clinical relevance development, composition and regulation therapeutical strategies. *Microb. Cell.* **8**, 28—56.
- Conlon B.P. (2014) Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease. BioEssays. 36, 991– 996.
- 21. Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167–193.
- Mulcahy L.R., Burns J.L., Lory S., Lewis K. (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 192, 6191–6199.

- 23. Percival S.L., Hill K.E., Malic S., Thomas D.W., Williams D.W. (2011) Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen.* **19**, 1–9.
- 24. Huemer M., Shambata S.M., Bergada-Pijuana J., Söderholmb S., Boumasmouda M., Vulin C., Gómez-Mejiaa A., Varela M.A., Tripathi V., Götschia S., Maggio E.M., Hasse B., Bruggera S.D., Bumann D., Schuepbach R.F., Zinkernagela A.S. (2021) Molecular reprogramming and phenotype switching in *Staphylococcus aureus* lead to high antibiotic persistence and affect therapy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 118, e2014920118.
- Davies J., Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417

  433.
- Levin B.R., Rozen D.E. (2006) Non-inherited antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 556–562.
- Sebastian J., Swaminath S., Nair R.R., Jakkala K., Pradhan A., Ajitkumar P. (2017) *De novo* emergence of genetically resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* from the persistence phase cells formed against antituberculosis drugs *in vitro*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. 61, e01343-16.
- 28. Van Acker H., Coenye T. (2017) The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 456–466.
- 29. Dwyer D.J., Collins J.J., Walker G.C. (2015) Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 313–332.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* 130, 797–810.
- Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. 334, 986–990.
- 32. Luhachack L., Nudler E. (2014). Bacterial gasotransmitters: an innate defense against antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **21C**, 13–17.
- 33. Kimura H. (2015) Signaling of hydrogen sulfide and polysulfides. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 347–349.
- 34. Szabo C. (2018) A timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: from environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.* **149**, 5–19.
- 35. Nzungize L., Kaisar M., Wang X., Huang X., Yang W., Duan X., Yan S., Li C., Abdalla A.E., Jeyakkumar P., Xie J. (2019) *Mycobacterium tuberculosis metC* (Rv3340) derived hydrogen sulphide conferring bacteria stress survival. *J. Drug Target.* 27, 1004–1016.
- Toliver-Kinsky T., Cui W., Törö G., Lee S.J., Shatalin K., Nudler E., Szabo C. (2018) H<sub>2</sub>S: a bacterial defense mechanism against the host immune response *Infect. Immun.* 87, e00272-18.
- 37. Walsh C. (2003) *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. Washington, DC: ASM.
- 38. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435.

- 39. Imlay J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418.
- Zhao X., Drlica K. (2014) Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 21, 1–6.
- 41. 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.
- 42. 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.
- 43. Wang X., Zhao X. (2009) Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1395–1402.
- 44. Greenberg J.T., Monach P., Chou J.H., Josephy P.D., Demple B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6181–6185.
- Oethinger M., Podglajen I., Kern W.V., Levy S.B. (1998) Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. 42, 2089–2094.
- 46. Koutsolioutsou A., Martins E.A., White D.G., Levy S.B., Demple B. (2001) A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (*serovar typhimurium*). *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 38–43.
- 47. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. (2006) Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. **50**, 949–954.
- 48. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. (2007) Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. **51**, 1119–1122.
- Albesa I., Becerra M.C., Battan P.C., Paez P.L. (2004) Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 605–609.
- 50. Becerra M.C., Albesa I. (2002) Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1003–1007.
- 51. Lewin C.S., Morrissey I., Smith J.T. (1991) The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 240–248.
- 52. Malik M., Hussain S., Drlica K. (2007) Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 28–34.
- Liu Y., Liu X., Qu Y., Wang X., Li L., Zhao X. (2012) Inhibitors of reactive oxygen species accumulation delay and/or reduce the lethality of several antistaphylococcal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6048– 6050.
- 54. Burger R.M., Drlica K. (2009) Superoxide protects *Escherichia coli* from bleomycin mediated lethality. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1273–1277.

- Mosel M., Li L., Drlica K., Zhao X. (2013) Superoxide-mediated protection of *Escherichia coli* from antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5755–5759
- 56. Girgis H.S., Hottes A.K., Tavazoie S. (2009) Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One* **4**, e5629.
- 57. 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.
- 58. Liu A., Tran L., Becket E., Lee K., Chinn L., Park E., Tran K., Miller J.H. (2010) Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1393–1403.
- 59. 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.
- 60. Becerra M.C., Paez P.L., Larovere L.E., Albesa I. (2006) Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol. Cell Biochem.* **285**, 29–34.
- Ling J., Cho C., Guo L.T., Aerni H.R., Rinehart J., Soll D. (2012) Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. *Mol. Cell.* 48, 713–722.
- 62. Zhang Y., Zhang J., Hoeflich K.P., Ikura M., Qing G., Inouye M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell.* **12**, 913–923.
- 63. Gerdes K., Christensen S.K., Lobner-Olesen A. (2005) Prokaryotic toxin—antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 371–382.
- 64. Dorsey-Oresto A., Lu T., Mosel M., Wang X., Salz T., Drlica K., Zhao X. (2013) YihE kinase is a central regulator of programmed cell death in bacteria. *Cell Rep.* 3, 528–537.
- 65. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J.J. (2008) Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell.* **135**, 679–690.
- Davies B.W., Kohanski M.A., Simmons L.A., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. (2009) Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli. Mol. Cell.* 36, 845–860.
- 67. Pogliano J., Lynch A.S., Belin D., Lin E.C., Beckwith J. (1997) Regulation of *Escherichia coli cell* envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev.* **11**, 1169–1182.
- 68. Raivio T.L., Silhavy T.J. (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **255**, 591–624.
- 69. Clarke P.H. (1953) Hydrogen sulphide production by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 397–407.

- Wang R. (2002) Wo's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J. 16, 1792–1798.
- 71. Adak S., Aulak K.S., Stuehr D.J. (2002) Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 16167–16171.
- Gusarov I., Nudler E. (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 13855–13860.
- 73. Gusarov I., Starodubtseva M., Wang Z.Q., McQuade L., Lippard S.J., Stuehr D.J., Nudler E. (2008) Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *J. Biol. Chem.* **283**, 13140–13147.
- 74. Wang R. (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* **92**, 791–896.
- Stoffels L., Krehenbrink M., Berks B.C., Unden G. (2012) Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force. *J. Bacteriol.* 194, 475–485.
- Mondovi B., Scioscia-Santoro A., Cavallinid D. (1963)
   Further evidence on the identity of cystathionase and cysteine desulfhydrase. *Arch. Biochem. Biophys.* 101, 363–364.
- Mikami Y., Shibuya N., Kimura Y., Nagahara N., Ogasawara Y., Kimura H. (2011) Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem. J.* 439, 479–485.
- Singh S., Banerjee R. (2011) PLP-dependent H<sub>2</sub>S biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814, 1518–1527.
- Loddeke M., Schneider B., Oguri T., Mehta I., Xuan Z., Reitzera L. (2017) Anaerobic cysteine degradation and potential metabolic coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 199, e00117-17.
- 80. Kimura Y., Goto Y.-I., Kimura H. (2010) Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox Signal* **12**, 1–13.
- 81. Kimura H. (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 783–793.
- Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E. (2009) Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*. 325, 380–1384.
- 83. Kers J.A., Wach M.J., Krasnoff S.B., Widom J., Cameron K.D., Bukhalid R.A., Gibson D.M., Crane B.R., Loria R. (2004) Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature*. **429**, 79–82.
- 84. Shatalin K., Gusarov I., Avetissova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E. (2008) *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 1009–1013.
- 85. Carlson H.K., Vance R.E., Marletta M.A. (2010) H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol*. 77, 930–942.

- 86. Bowman L.A., McLean S., Poole R.K., Fukuto J.M. (2011) The diversity of microbial responses to nitric oxide and agents of nitrosative stress close cousins but not identical twins. *Adv. Microb. Physiol.* **59**, 135–219.
- 87. Gusarov I., Gautier L., Smolentseva O., Shamovsky I., Eremina S., Mironov A., Nudler E. (2013) Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans. Cell.* **152**, 818–830.
- 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 H<sub>2</sub>S-mediated protection against oxidative stress in *E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114, 6022–6027.
- 89. Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* **264**, 20509–20512.
- 90. 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.
- 91. Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177.
- 92. Hantke K., Braun V. (2000) The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In: *Bacterial stress responses*. Eds Storz G., Hengge-Aronis R. Washington DC: ASM, 275–288.
- 93. Touati D., Jacques M., Tardat B., Bouchard L., Despied S. (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 177, 2305–2314.
- 94. Keyer K., Imlay J.A. (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 13635–13640.
- 95. Keyer K., Gort A.S., Imlay J.A. (1995) Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **177**, 6782–6790.
- 96. Park S., Imlay J.A. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950.
- 97. Kredich N.M. (1983) Amino acids: biosynthesis and genetic regulation. In: *Regulation of cysteine biosynthesis in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Ed. Herrmann K.M. Sommervilleth edition. United Kingdom London: Addison-Wesley Publ. Comp. 115–132.
- 98. Kredich N.M. (1992) The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* **6**, 2747–2753.
- Shatalin K., Nuthanakanti A., Kaushik A., Shishov D., Peselis A., Shamovsky I., Pani B., Lechpammer M., Vasilyev N., Shatalina E., Rebatchouk D., Mironov A., Fedichev P., Serganov A., Nudler E. (2021) Inhibitors of bacterial H<sub>2</sub>S biogenesis targeting antibiotic resistance and tolerance. *Science*. 372, 1169–1175.

### THE ENHANCEMENT OF BACTERICIDAL EFFECT OF ANTIBIOTICS AS A RESULT OF INHIBITION OF ENZYMES INVOLVED IN PRODUCTION OF HYDROGEN SULFIDE IN BACTERIA

T. A. Seregina<sup>1, \*</sup>, K. V. Lobanov<sup>1</sup>, R. S. Shakulov<sup>1</sup>, and A. S. Mironov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

It is still the actual problem for medical society all other the world to counteract the origin and distribution of multidrug resistant pathogens responsible for intra-hospital infections. In this brief review we discuss results of our recent investigations which argue that many antibiotics along with inactivation of their traditional biochemical targets can induce oxidative stress (ROS production) which results in increased bactericidal efficiency of the applied antibiotics. As we have estimated previously, hydrogen sulfide produced in the cells of different pathogens protects them not only of oxidative stress but also of bactericidal antibiotics. Next, we have cleared out the interplay of oxidative stress, cysteine metabolism and hydrogen sulfide production. Finally, we have demonstrated that small molecules that inhibit bacterial enzyme involved in hydrogen sulfide production potentiate bactericidal antibiotics including quinolones, beta-lactams and aminoglycosides against bacterial pathogens in vitro and in mouse models of infection. These inhibitors also suppress bacterial tolerance, disrupting biofilm formation and substantially reducing the number of persister bacteria that survive antibiotic treatment. We suppose the agents limiting the hydrogen sulfide biosynthesis to be the effective tools to counteract the origin and distribution of multidrug resistant pathogens.

**Keywords:** bacteria, antibiotics, oxidative stress, hydrogen sulfide generation, inhibitors of hydrogen sulfide generation ferments, new class of antimicrobial drugs