

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ

УДК 579.2

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТИОЛЫ КАК ФАКТОР, УСИЛИВАЮЩИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МУТАНТОВ *Escherichia coli* С НАРУШЕННЫМ СИНТЕЗОМ ADP-ГЕПТОЗЫ К АНТИБИОТИКАМ

© 2023 г. Т. А. Серегина^{а, *, #}, И. Ю. Петрушанко^{а, **, #}, П. И. Зарипов^а, Ю. Д. Кулешова^а,
К. В. Лобанов^а, Р. С. Шакулов^а, В. А. Митькевич^а, А. А. Макаров^а, А. С. Миронов^а

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

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

**e-mail: irina-pva@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2023 г.

После доработки 13.07.2023 г.

Принята к публикации 13.07.2023 г.

Низкомолекулярные тиолы, такие как глутатион и цистеин, являются неотъемлемой частью системы редокс-регуляции клетки. Ранее мы показали, что на фоне инактивации синтеза ADP-гептозы, связанной с делецией *gmhA*, в клетках *Escherichia coli* развивается окислительный стресс, сопровождающийся перестройкой гомеостаза тиолов и повышением чувствительности к антибиотикам. В представленной работе обнаружено, что ограничение метаболизма цистеина ($\Delta cysB$ и $\Delta cysE$) и ингибирование синтеза глутатиона ($\Delta gshAB$) приводят не к ожидаемому возрастанию, а к снижению чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам. В то же время блокирование экспорта цистеина ($\Delta eamA$) или увеличение импорта ($P_{tet}-tcyP$) цистина, являющего окисленной формой цистеина, приводит к еще большей чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам. Кроме того, не наблюдается корреляции цитотоксического действия антибиотиков с уровнем активных форм кислорода, общим пулом тиолов или жизнеспособностью исходной популяции клеток. Однако выявлена корреляция между чувствительностью к антибиотикам и долей окисленного глутатиона в клетках. Снижение содержания низкомолекулярных тиолов, по-видимому, сберегает эквиваленты NADPH и ограничивает процессы редокс-модификации белков, повышая устойчивость штамма $\Delta gmhA$ к действию антибактериальных препаратов, тогда как повышение их уровня, напротив, требует большего расхода ресурсов клетки, приводит к росту окисленного глутатиона и вызывает еще большее увеличение чувствительности данного штамма *E. coli* к антибиотикам.

Ключевые слова: низкомолекулярные тиолы, синтез ADP-гептозы, чувствительность к антибиотикам, глутатион, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026898423060162, EDN: QNHRSN

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм низкомолекулярных тиолов в клетках бактерий играет важную роль в поддержании редокс-баланса при воздействии антибактериальных препаратов, окислителей и других стрессовых агентов [1–4]. Цистеин и глутатион принимают участие в регуляции различных биосинтетических процессов, приводя к редокс-зависимой модификации белков, что модулирует активность ферментов [5, 6]. Ранее нами были изучены показатели тиолового гомеостаза в мутантах *Escherichia coli* по генам биосинтеза ADP-гептозы, одного из компонентов клеточной стенки [7]. Следует отметить, что мутанты, утратившие ADP-гептозу в составе липополисахаридов (ЛПС), обнаруживают сверхчувствительность к

действию антибиотиков, однако механизм возникновения этой чувствительности остается неизвестным. Показано, что делеции генов *gmhA*, *hldE*, *rfaD* и *waaC*, кодирующих ферменты пути синтеза ADP-гептозы, провоцируют значительное снижение внутриклеточного пула цистеина с одновременным повышением общего пула восстановленных тиолов. Наряду с изменением профиля серосодержащих метаболитов, в клетках, утративших ADP-гептозу, наблюдается повышение уровня генерации активных форм кислорода (АФК), сопровождающиеся истощением восстановительных эквивалентов NADPH. Таким образом, потеря ADP-гептозы приводит к развитию мощного окислительного стресса и перестройке гомеостаза тиолов в клетках *E. coli*.

В клетках *E. coli* основным внутриклеточным низкомолекулярным тиолом в норме является

[#] Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

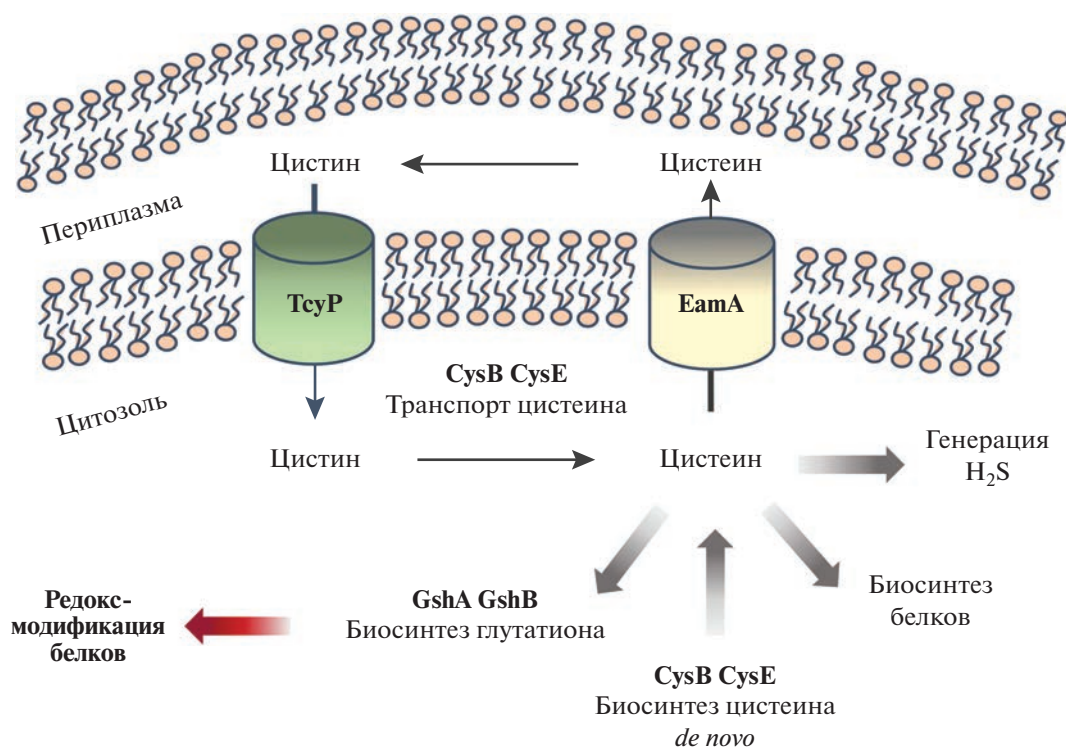


Рис. 1. Схема метаболизма низкомолекулярных тиолов в клетках *E. coli*. Ген *cysB* кодирует транскрипционный регулятор генов цистеинового гомеостаза и контролирует синтез цистеина *de novo* и работу системы транспортеров TcyP и EamA.

восстановленный трипептид глутатион (GSH), содержание которого (2–4 мМ) существенно выше, чем содержание цистеина (0.1–0.2 мМ) [4]. Возможно, это связано с тем, что хотя стандартные редокс-потенциалы пар цистеин–цистин (–250 мВ при pH 7.4) и пары восстановленный глутатион/окисленный глутатион (GSH/GSSG) (–264 мВ при pH 7.4) близки [8], цистеин более эффективно восстанавливает железо и обладает большей генотоксичностью [4]. Внутриклеточная концентрация цистеина определяется интенсивностью процессов синтеза *de novo* и транспорта. В клетках *E. coli* гены биосинтеза и транспорта цистеина объединены в один регулон под контролем транскрипционного регулятора *cysB* [9]. CysB нуждается в кофакторе *O*-ацетилсерине, который синтезируется из *L*-серина ацетилтрансферазой CysE. Кроме того, *O*-ацетилсерин является интермедиатом пути биосинтеза цистеина [10]. Таким образом, синтез и транспорт цистеина зависят от активности генов *cysB* и *cysE* (рис. 1). Транспортная система цистеина представляет собой так называемый шаттл, в котором транспортер TcyP осуществляет перенос окисленной формы цистеина — цистина, из периплазматического пространства в цитоплазму [11] (рис. 1). В цитоплазме цистин подвергается быстрому восстановлению и транспортер EamA возвращает цистеин обратно в периплазму [12] (рис. 1). Ген *eamA* не входит в состав регулона *cysB*.

Синтез глутатиона в клетках *E. coli* осуществляется глутамат-цистеин-лигазой GshA и глутатионсинтазой GshB (рис. 1). Хотя GSH не является незаменимым тиолом для клеток *E. coli*, он играет критическую роль в защите от экологических стрессов, включая осмотический шок, кислотность, защиту от токсинов и окислительного стресса, вызванного пероксидами [13].

Поскольку в мутантах *E. coli*, утративших ADP-гептозу в составе ЛПС клеточной стенки, нарушен тиоловый гомеостаз и повышена чувствительность к антибиотикам, мы предположили, что введение мутаций в гены метаболизма цистеина и глутатиона может играть критическую роль в модуляции их чувствительности к антибиотикам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы. Используемые в работе штаммы *E. coli* и их генотип представлены в табл. 1.

Делеционные мутанты получали, выращивая фаг P1 на штаммах из коллекции Keio [17], содержащих инсерции *cysB::kan*, *cysE::kan*, *gshA::kan*, *gshB::kan* и *emaA::kan*, с последующей трансдукцией в геном штамма *E. coli* MG1655 [18]. Из полученных штаммов с помощью хелперной плазмиды pCP20 удаляли канамициновую кассету [19] с образованием соответствующих делеций ($\Delta cysB$,

$\Delta cysE$, $\Delta gshA$, $\Delta gshB$ и $\Delta emaA$). Наличие делеций подтверждали с помощью ПЦР. Получение штамма, содержащего делецию гена *gmhA*, описано в работе [7], а $P_{tet-tycP}$ – в [16].

Среды и условия культивирования. В качестве полноценной питательной среды для выращивания бактерий использовали среду LB без глюкозы [20]. В жидкой среде бактерии культивировали в термостатированном шейкере (200 об./мин). При необходимости в среду добавляли: налидиксовую кислоту – 0.25 мкг/мл, тетрациклин – 0.75 мкг/мл, ампициллин – 50 мкг/мл, канамицин – 20 мкг/мл.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам. Способность к образованию колоний оценивали методом микроразведений. Ночные бактериальные культуры разводили в 100 раз и подрачивали в термостатированном шейкере при 37°C до оптической плотности $OD_{600} = 0.5–0.6$. Все суспензии выравнивали по оптической плотности. Из полученных культур готовили серию десятикратных разведений в 96-луночном планшете в объеме 100 мкл. Полученные разведения высевали на чашки с богатой средой, содержащей различные концентрации исследуемых антибиотиков. Чашки инкубировали в течение ночи в термостате при 37°C. Результат фотографировали с помощью аналитической системы GelCamera M-26XV.

Определение жизнеспособности и редокс-статуса клеток с использованием проточной цитометрии. Клетки выращивали в полноценной среде до оптической плотности 0.4, затем отмывали дважды в фосфатном буфере (PBS), центрифугировали, удаляли супернатант и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Жизнеспособность и редокс-статус клеток оценивали с помощью проточной цитометрии на цитофлуориметре BD LCR Fortessa (“Becton Dickinson”, США). Клеточную популяцию *E. coli* гейтировали по параметрам малоуглового (FSC) и бокового рассеяния (SSC), которые характеризуют размер и гранулярность клеток соответственно. Процент мертвых клеток в популяции оценивали, используя пропидий йодид ($Ex/Em = 535/617$ нм, “Sigma-Aldrich”, США), который добавляли к клеткам до концентрации 10 мкг/мл за 1 мин до начала анализа. Пропидий йодид проникает в клетки с поврежденной мембраной, его связывание с ДНК приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции в красной области спектра. Редокс-статус клеток *E. coli* характеризовали по уровню АФК и внутриклеточных тиолов, значительную часть которых составляет глутатион (GSH). Уровень АФК оценивали с помощью дигидрородамина 123 (DHR123) ($Ex/Em = 507/525$ нм, “ThermoFisher Scientific”, США) [7], который добавляли к клеткам до конечной концентрации 7.5 мкМ, а затем инкубировали клетки в течение 1 ч в темноте при 37°C.

Таблица 1. Генотип и происхождение использованных штаммов *E. coli*

Штамм	Генотип	Происхождение
MG1655	F ⁻ дикий тип	[14]
AM4011	Как MG1655, но $\Delta gmhA$	[7]
AM4022	Как MG1655, но $\Delta cysB$	[15]
AM4041	Как AM4011, но $\Delta cysB$	Данная работа
AM4023	Как MG1655, но $\Delta cysE$	[15]
AM4042	Как AM4011, но $\Delta cysE$	Данная работа
AM4043	Как MG1655, но $\Delta gshA \Delta gshA$	Данная работа
AM4044	Как AM4011, но $\Delta gshA \Delta gshA$	Данная работа
AM4045	Как MG1655, но $\Delta emaA$	[16]
AM4046	Как AM4011, но $\Delta eamA$	Данная работа
AM4047	Как MG1655, но $P_{tet-tycP}$	[16]
AM4031	Как AM4011, но $P_{tet-tycP}$	Данная работа

Уровень внутриклеточных тиолов оценивали с помощью красителя ThiolTracker Violet ($Ex/Em = 405/526$ нм, “ThermoFisher Scientific”) [7], который добавляли в концентрации 10 мкМ, и инкубировали клетки в течение 1 ч при 37°C. Внутриклеточные тиолы и АФК оценивали в клетках с неповрежденной мембраной, которые не окрашиваются пропидий йодидом. Данные цитометрии анализировали с помощью программы FlowJo (“BD Biosciences”).

Определение уровня внутриклеточного глутатиона с помощью реактива Элмана. Клетки *E. coli* ($OD_{600} 0.5$) дважды отмывали натрий-фосфатным буфером (100 мМ Na-фосфатный буфер (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4), 0.5 мМ EDTA, pH 7.5) и лизировали с помощью трехкратной процедуры замораживания (жидкий азот, -196°C)—оттаивания (37°C). После последнего оттаивания пробы ставили в лед и добавляли трихлоруксусную кислоту (ТХУ) до концентрации 5%. После осаждения белков пробы центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин, при температуре 4°C. Супернатант отбирали и использовали далее для определения глутатиона с помощью реактива Элмана (5,5'-дителиобис-2-нитробензойная кислота, DTNB) методом спектрофотометрии, поскольку продукт восстановления DTNB обладает сильным поглощением при 412 нм. Для построения калибровочной кривой использовали восстановленный глутатион, растворенный в 5% ТХУ. К осадку добавляли раствор щелочи до pH 7.4, в котором растворяли осадок, полученный раствор использовали для оценки количества белка в пробах с использованием бицинониновой кислоты (BCA). Полученные значения количества глутатиона в пробе нормировали на количество белка в данной пробе.

Определение доли восстановленного и окисленного глутатиона в клетках. Количественное определение уровня внутриклеточного глутатиона в

данном случае проводили модифицированным методом Титца [21]. Клетки ночной культуры (100 мкл) переносили в 10 мл свежей среды LB и подращивали до OD₆₀₀ 0.5. Клетки из 5 мл суспензии осаждали центрифугированием и суспендировали в лизирующем буфере KPE с добавлением 0.1% Triton X100. Клетки гомогенизировали пестиком и центрифугировали (11 000 об/мин, 5 мин при 4°C). Супернатант переносили в чистые пробирки. Реакционную смесь, состоящую из 20 мкл клеточного экстракта и равных объемов (60 мкл) DTNB, глутатионредуктазы и NADPH инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре, после чего измеряли поглощение при 412 нм. Для построения калибровочной кривой использовали GSH (“Sigma Aldrich”, США). Полученные значения относили к концентрации суммарного белка и выражали в процентах. Для определения окисленной формы глутатиона (GSSG) клеточные экстракты обрабатывали 2-винилпиридином как описано в [21]. Для построения калибровочной кривой использовали окисленный глутатион (“Sigma Aldrich”). Рассчитывали процент восстановленного и окисленного глутатиона в пробах.

Статистический анализ данных. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартные отклонения, полученные из 3–4 экспериментов. Статистическую разницу между экспериментальными группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки для множественных сравнений. Различия между средними для групп значениями считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism 9.1.2 software (GraphPad Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболизм низкомолекулярных тиолов и чувствительность мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам

Поскольку инактивация генов биосинтеза ADP-гептозы приводит к значительным изменениям в метаболизме низкомолекулярных тиолов в клетках *E. coli* [7], которые являются компонентами системы редокс-регуляции, защищающей бактериальные клетки в различных стрессовых условиях [1, 3, 12, 13], изменение метаболизма низкомолекулярных тиолов могло привести к еще более выраженному увеличению чувствительности данных штаммов к антибиотикам. В настоящей работе нами получены мутанты $\Delta gmhA$, несущие делеции генов регуляции цистеинового гомеостаза *cysB* и *cysE*, транспорта цистеина (*eamA*) и сверхэкспрессирующий ген транспорта цистина (*tcyP*), а также делеции генов биосинтеза глутатиона *gshA* и *gshB* (рис. 1), и изучено влияние этих делеций на чувствительность мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам.

Как следует из данных, представленных на рис. 2, ограничение метаболизма цистеина (делеции генов *cysB* и *cysE*) приводит к значительной супрессии чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам как бактерицидного (налидиксовая кислота), так и бактериостатического действия (тетрациклин). Кроме того, блокирование биосинтеза глутатиона (делеции *gshA* и *gshB*) также повышает устойчивость штамма $\Delta gmhA$ к исследуемым антибиотикам. С другой стороны, изменение работы системы транспорта цистеина, направленное на повышение его внутриклеточной концентрации, усиливает чувствительность клеток $\Delta gmhA$ к налидиксовой кислоте (рис. 2).

Уровень внутриклеточных низкомолекулярных тиолов в мутантах $\Delta gmhA$ на фоне генетической модификации метаболизма цистеина и глутатиона

Ограничение метаболизма цистеина, обусловленное делециями генов *cysB* и *cysE*, а также ингибирование синтеза глутатиона (делеции *gshA* и *gshB*) приводят к значительному снижению уровня низкомолекулярных тиолов (на 65, 45 и 72% по сравнению с контролем соответственно) (рис. 3а). Это снижение сохраняется в присутствии дополнительной делеции $\Delta gmhA$ в случае $\Delta gmhA \Delta cysE$ и $\Delta gmhA gshAB$ или становится еще более выраженным в случае $\Delta gmhA \Delta cysB$. В то же время, увеличение уровня цистеина при сверхэкспрессии гена *tcyP* ($P_{tet-tcyP}$), который кодирует белок, осуществляющий транспорт цистина [22] и сульфоцистеина из периплазмы в цитоплазму клетки [23], не вызывает снижения, а, напротив, приводит к небольшому повышению (на 12%) низкомолекулярных внутриклеточных тиолов. Сверхэкспрессия данного гена в сочетании с делецией *gmhA* приводит к снижению низкомолекулярных тиолов, однако оно не очень значительно и составляет всего 21%. Делеция гена *eamA*, кодирующего белок, экспортирующий цистеин (рис. 1), также не вызывает снижения содержания низкомолекулярных тиолов, а его сочетание с делецией *gmhA* приводит лишь к такому же небольшому снижению, как и одиночная делеция *gmhA* (рис. 3а). При делеции $\Delta eamA$ и сверхэкспрессии $P_{tet-tcyP}$ в штамме с делецией $\Delta gmhA$ наблюдается повышение уровня окисленной формы глутатиона (GSSG), тогда как дополнительные делеции $\Delta cysE$, $\Delta cysB$ и $\Delta gshAB$ вызывают снижение доли GSSG в клетках *E. coli* с $\Delta gmhA$ (рис. 3б).

*Влияние изменений метаболизма тиолов и делеции $\Delta gmhA$ на редокс-статус и жизнеспособность клеток *E. coli**

Влияние изменений метаболизма тиолов в комбинации с делецией $\Delta gmhA$ на редокс-статус клеток оценивали, измеряя с помощью флуорес-

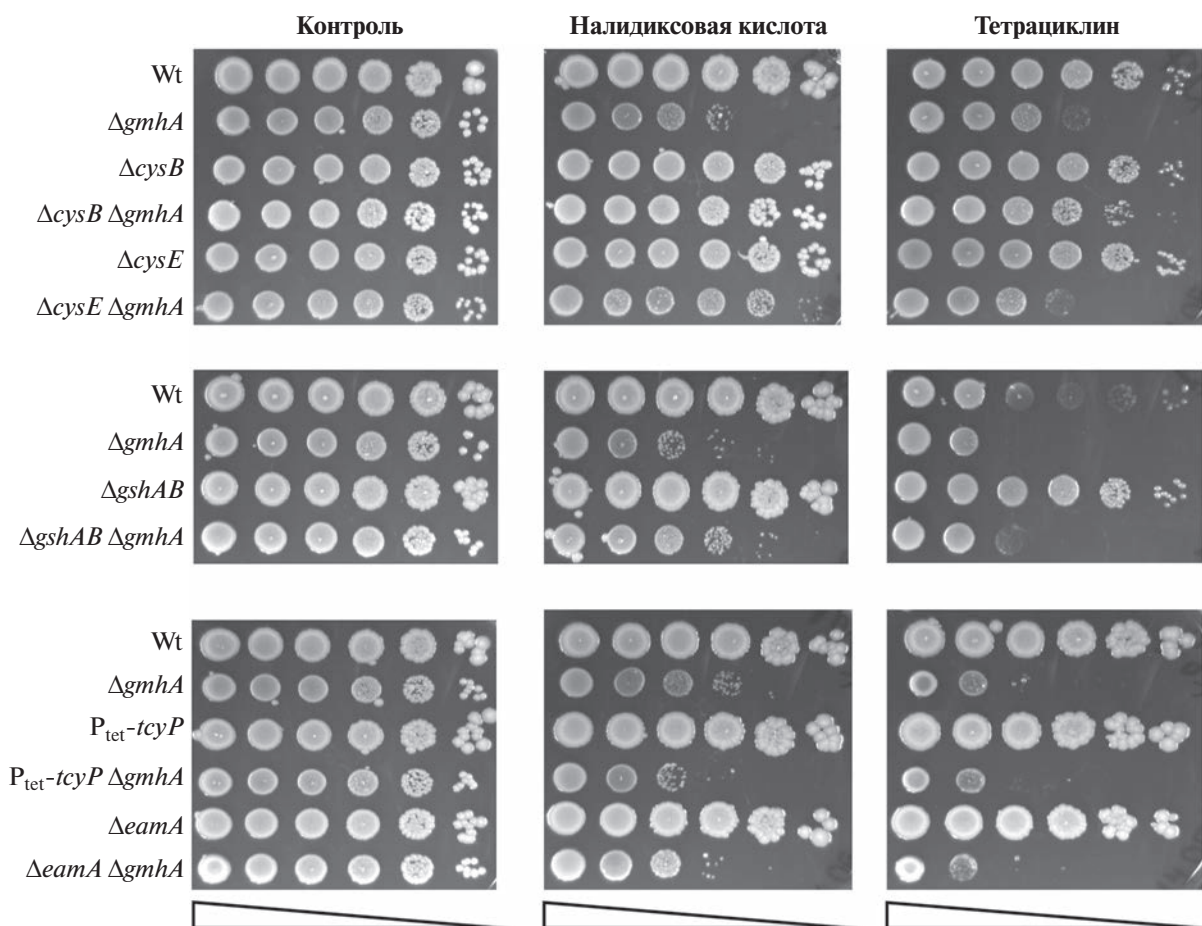


Рис. 2. Влияние модулирования метаболизма низкомолекулярных тиолов на чувствительность мутанта $\Delta gmhA$ к налидиксовой кислоте (0.25 мкг/мл) и тетрациклину (0.75 мкг/мл). Инактивация генов биосинтеза цистеина *cysB* и *cysE*, а также генов биосинтеза глутатиона *gshA* и *gshB* вызывает супрессирующий эффект. Активация транспорта цистеина внутрь клетки ($P_{tet-tycP}$) и ограничение экспорта цистеина ($\Delta eamA$) повышают чувствительность штамма $\Delta gmhA$ к налидиксовой кислоте.

центных красителей уровень тиолов и АФК в популяции живых клеток *E. coli* с неповрежденной мембраной (рис. 4). Установлено, что полный пул внутриклеточных тиолов снижается при ограничении метаболизма цистеина в результате делеций генов *cysB* и *cysE* на 54 и 62%, при ингибировании синтеза глутатиона (делеции *gshAB*) на 56%, а при усилении импорта цистина ($P_{tet-tycP}$) или замедлении экспорта цистеина ($\Delta eamA$) на 48 и 40% соответственно (рис. 4а). При этом, как описано нами ранее, делеция *gmhA* приводит к возрастанию полного пула внутриклеточных тиолов более чем в 3 раза [7]. Это влияние на редокс-статус оказывается настолько сильным, что даже при комбинации делеций генов, нарушающих метаболизм тиолов (*cysB*, *cysE*, *gshAB*) и транспорт цистина ($P_{tet-tycP}$ и $\Delta eamA$), содержание тиолов в двойных мутантах остается повышенным по сравнению с клетками дикого типа (рис. 4а). Наибольшее снижение этого эффекта наблюдалось при делеции *cysE*; в двойных мутантах ($\Delta cysE \Delta gmhA$) уро-

вень тиолов был существенно ниже, чем в клетках с одиночной делецией $\Delta gmhA$, и лишь на 47% превышал значение в контрольных клетках дикого типа. При делеции *cysB* это снижение было незначительным по сравнению с одиночным мутантом $\Delta gmhA$.

Оценка уровня АФК показала, что одиночные мутации в генах метаболизма цистеина и глутатиона, а также в генах транспорта цистина и цистеина приводят к некоторому снижению уровня АФК (рис. 4б). Делеция $\Delta gmhA$, как показано нами ранее, вызывает умеренное (менее чем в 2 раза) повышение уровня АФК. Однако при комбинации делеции *gmhA* с делецией *cysB*, нарушающей метаболизм цистеина, и делецией *gshAB*, нарушающей синтез GSH, наблюдается резкое (более чем в 5–6 раз) возрастание уровня АФК в клетках (рис. 4б). Это свидетельствует об истощении системы редокс-регуляции, не позволяющей компенсировать окислительный стресс, вызванный инактивацией гена биосинтеза ADP-гептозы.

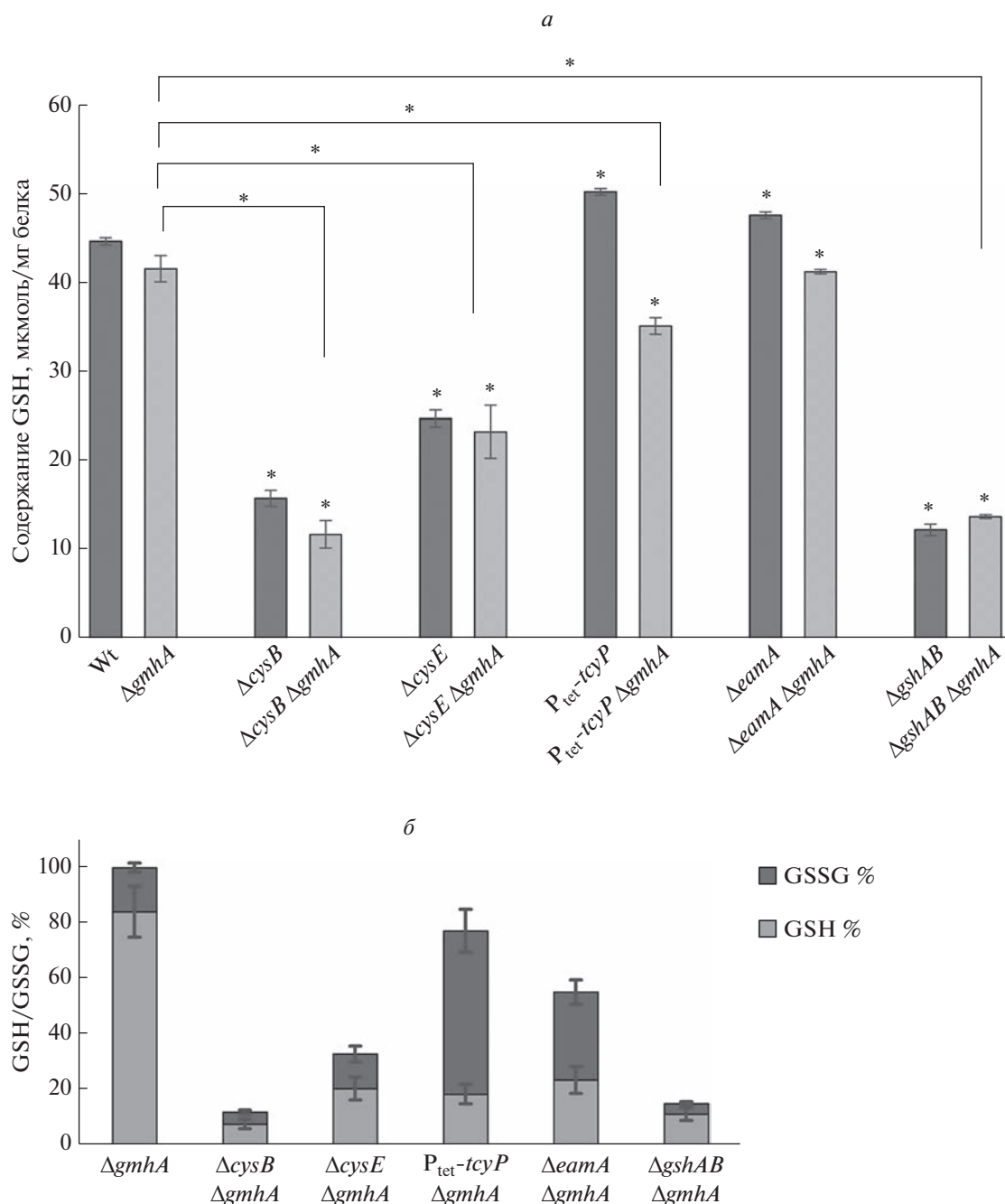


Рис. 3. Уровень внутриклеточных низкомолекулярных тиолов (GSH) (*a*) и соотношение GSH/GSSG (*b*) в популяции клеток *E. coli* с делецией генов *gmhA*, *cysB*, *cysE*, *eamA*, *gshAB*, сверхэкспрессией гена *tycP* (P_{tet}-*tycP*) и их сочетания с делецией гена *gmhA*. *a* — Уровень внутриклеточных низкомолекулярных тиолов в клетках с одиночными делециями и сверхэкспрессией обозначен серыми столбцами, уровень тиолов при совместных делециях и сверхэкспрессии в сочетании с делецией гена *gmhA*, обозначен штриховкой. *b* — Доля восстановленного глутатиона (GSH) показана светло-серым цветом; доля окисленного глутатиона (GSSG) — темно-серым. Приведены средние значения $\pm$ SD, полученные из трех независимых экспериментов. Звездочками над столбцами обозначено различие между контрольными и опытными образцами, звездочками над чертой отличия между одиночной мутацией *ΔgmhA* и мутантными штаммами, содержащими *ΔgmhA*. **p* < 0.05.

Однако делеция гена *cysE*, которая максимально снижала повышенный уровень GSH в клетках с делецией гена *gmhA* (рис. 3), полностью нивелирует возрастание уровня АФК, индуцированного данной делецией (рис. 4б).

Увеличение пула внутриклеточного цистина, вызванное повышением его импорта (P_{tet}-*tycP*) или замедлением экспорта цистеина (*ΔeamA*) в клетках с делецией *gmhA*, также приводит к росту АФК более чем в 3 и 4 раза соответственно. Это

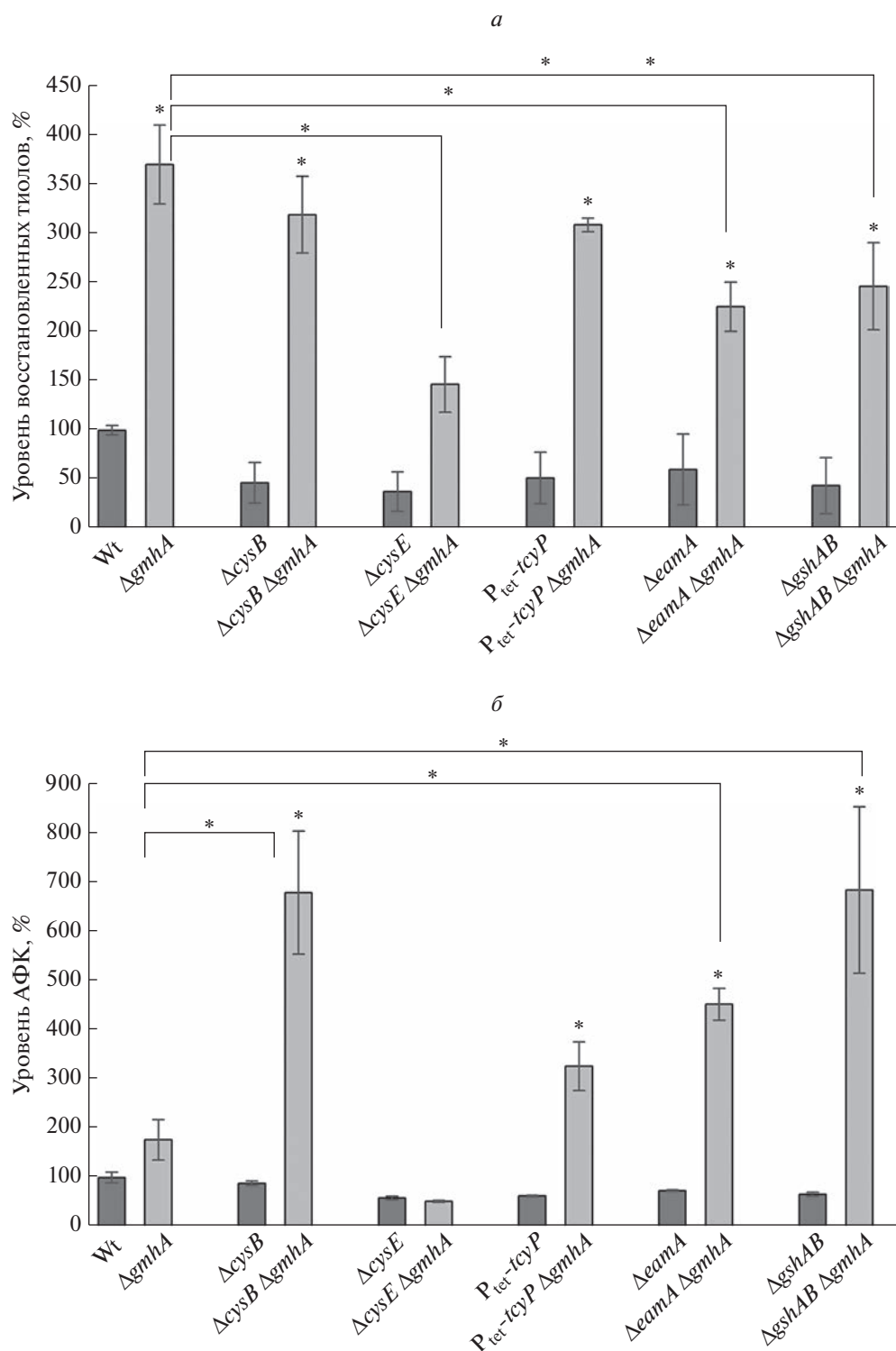


Рис. 4. Изменение уровня внутриклеточных тиолов и уровня АФК в популяции клеток *E. coli* с делецией генов *gmhA*, *cysB*, *cysE*, *eamA*, *gshAB*, сверхэкспрессией гена *tycP* ($P_{tet-tycP}$) и их сочетания с делецией гена *gmhA*. Уровень тиолов (а) и АФК (б) в клетках с вышеперечисленными одиночными делециями и сверхэкспрессией гена *tycP* обозначен темно-серыми столбцами; уровень тиолов при совместных делециях и сверхэкспрессии в сочетании с делецией *gmhA* обозначен светло-серыми столбцами. Приведены средние значения $\pm$ SD из трех независимых экспериментов. Звездочками над столбцами обозначено различие между контрольными и опытными образцами, звездочками над чертой показаны отличия между одиночной делецией $\Delta gmhA$ и мутантными штаммами, содержащими $\Delta gmhA$. * $p < 0.05$.

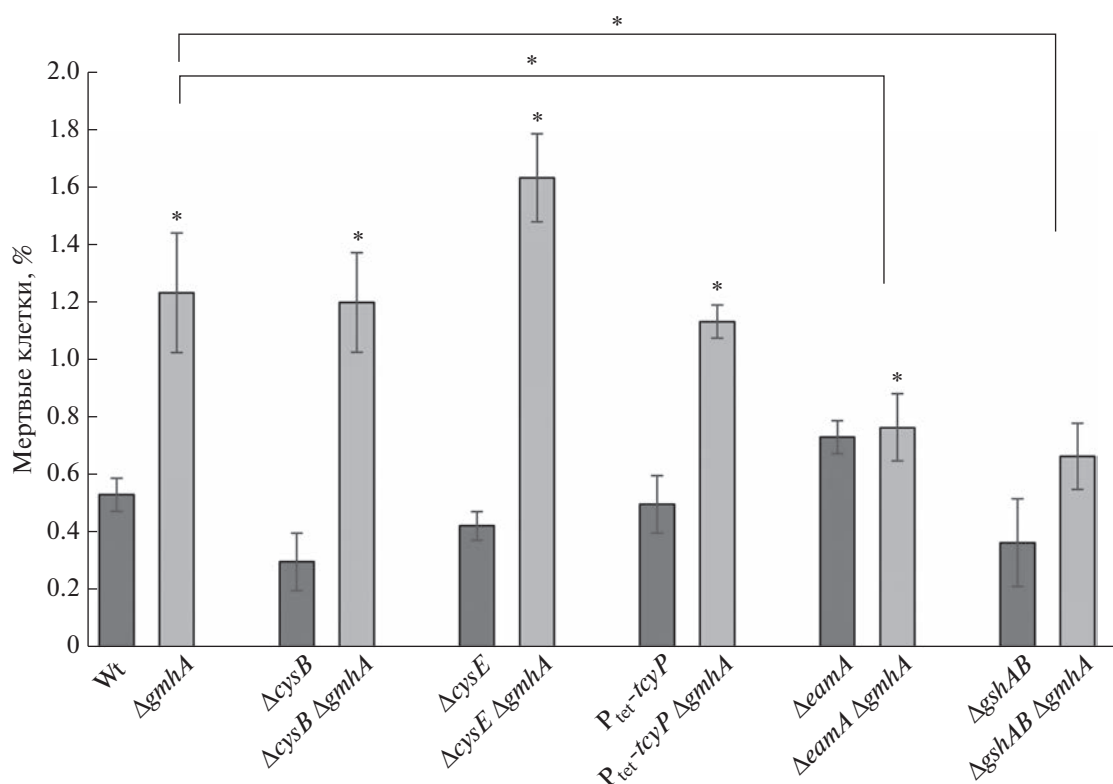


Рис. 5. Изменение доли мертвых клеток (%) в популяции клеток *E. coli* с делецией генов *gmhA*, *cysB*, *cysE*, *eamA*, *gshAB*, сверхэкспрессией гена *tycP* ($P_{tet-tycP}$) и их сочетания с делецией гена *gmhA*. Доли мертвых клеток с вышеперечисленными одиночными делециями и сверхэкспрессией гена *tycP* показаны темно-серыми столбцами, уровень тиолов при совместных делециях и сверхэкспрессии в сочетании с делецией *gmhA* обозначен светло-серыми столбцами. Приведены средние значения $\pm$ SD из трех независимых экспериментов. Звездочками над столбцами обозначено различие между контрольными и опытными образцами; звездочками над чертой показаны отличия между штаммом с одиночной делецией *ΔgmhA* и мутантными штаммами, содержащими *ΔgmhA*. * $p < 0.05$.

объясняется дополнительной нагрузкой на редокс-систему клеток и тратой восстановительных эквивалентов на восстановление цистина.

Таким образом, снижение ресурсов систем антиоксидантной защиты при делеции *gmhA* приводит к развитию значительного окислительного стресса.

Одиночные мутации в генах метаболизма цистеина, глутатиона, а также транспорта цистина и цистеина не приводят к повышению числа (%) мертвых клеток в популяции (рис. 5). Однако внесение дополнительной делеции *gmhA* в клетки с мутациями *ΔcysB*, *ΔcysE* и $P_{tet-tycP}$ приводит к возрастанию содержания мертвых клеток в популяции, также как и одиночная делеция *gmhA*, что свидетельствует о снижении жизнеспособности клеток. В случае совместной делеции генов синтеза глутатиона *gshAB* и делеции гена *gmhA* процент мертвых клеток ниже, чем при одиночной делеции *gmhA* (рис. 5). А в клетках с делецией *eamA* дополнительная делеция *gmhA* вообще не приводит к возрастанию количества мертвых клеток в популяции (рис. 5). Необходимо отметить, что для клеток с исследуемыми мутациями, несущих

при этом делецию *gmhA*, не наблюдалось корреляции процента мертвых клеток в популяции с уровнем АФК (рис. 4, 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно традиционным представлениям, низкомолекулярные тиолы — сероводород, цистеин, глутатион — защищают клетки бактерий дикого типа от окислительного стресса [1, 3, 23]. Однако на фоне инактивации синтеза ADP-гептозы в клетках *E. coli* с делецией *gmhA* развивается окислительный стресс, сопровождающийся снижением пула восстановительных эквивалентов NADPH и редуктивной емкости цитоплазмы [7]. Подобный редокс-дисбаланс, по-видимому, ведет к возрастанию в клетках количества окисленных форм низкомолекулярных тиолов и, как следствие, к депрессии (снижению эффективности) защитных механизмов с участием тиолов. Кроме того, резкое снижение внутриклеточного пула цистеина и генерации H_2S , сопровождающееся повышением уровня восстановленных тиолов, в клетках мутанта *ΔgmhA* [7] может свидетельство-

вать о перераспределении серосодержащих метаболитов и возможных редокс-модификациях белков.

В данной работе нами обнаружено, что ограничение метаболизма цистеина ($\Delta cysB$ и $\Delta cysE$) и ингибирование синтеза глутатиона ($\Delta gshAB$) приводят не к ожидаемому возрастанию, а к снижению чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам, что особенно ярко выражено в случае такого бактерицидного антибиотика, как налидиксовая кислота. Полученные результаты позволяют предположить, что инактивация биосинтеза ADP-гептозы в клетках *E. coli* провоцирует развитие окислительного стресса, который сопровождается каскадными необратимыми редокс-модификациями белков с участием цистеина и глутатиона. Снижение общей концентрации низкомолекулярных тиолов ограничивает процессы глутатионилирования и цистеинилирования различных ферментов, снимая токсический эффект и повышая устойчивость штамма $\Delta gmhA$ к действию антибактериальных препаратов. Редокс-чувствительные цистеиновые остатки зачастую входят в каталитические центры ферментов центрального метаболизма, в частности, ферментов пентозофосфатного пути — транскетолазы и рибулозо-5-фосфат-эпимеразы [24, 25]. Снижение каталитической активности таких ферментов или их полная инактивация могут драматически сказаться на способности клеток осуществлять жизненно важные анаболические процессы и снижать адаптивный потенциал клеток. Кроме того, поскольку уровень цистеина должен поддерживаться в пределах 0.1–0.2 мМ для предотвращения генотоксичности, а его выкачивание из клетки требует расхода энергии [4], то снижение пула цистеина может сохранить ресурсы клетки, что критично при их недостатке (АТФ и NADPH), наблюдаемом, как показано нами ранее [7], у мутантов с делецией *gmhA*. Действительно, мы наблюдали снижение доли окисленного глутатиона в штаммах $\Delta gmhA \Delta cysE$, $\Delta gmhA \Delta cysB$ и $\Delta gmhA gshAB$ *E. coli*, что свидетельствует об эффективном восстановлении имеющегося глутатиона в данных штаммах, несмотря на снижение общего количества глутатиона (рис. 3).

Блокирование экспорта цистеина ($\Delta eamA$) или увеличение импорта ($P_{tet}-tcyP$) в клетки цистина, являющего окисленной формой цистеина, приводит к еще большему повышению чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам. Это связано с дополнительным истощением пула NADPH, который и так существенно снижен при ингибировании биосинтеза ADP-гептозы [7], поскольку накопление в клетке цистина должно увеличивать расход восстановительных эквивалентов (NADPH) для восстановления цистина до цистеина [22]. Повышение концентрации цистина опасно для клетки, так как цистин способствует образованию дисульфидных мостиков в белках,

что влияет на их функционирование [27]. Например, таким образом цистин активирует щелочную фосфатазу [27]. Поэтому клетка старается быстро восстановить цистин, который в результате в нормальных условиях присутствует в малом количестве [28]. Вследствие этого не реализуется ингибирование импортера цистина продуктом (цистином), и он продолжает закачиваться в клетки. Наблюдаемое нами возрастание доли окисленной формы глутатиона GSSG при $\Delta eamA$ (рис. 3б) обусловлено повышением содержания цистина в клетке, которое способствует увеличению окисления тиоловых групп с образованием дисульфидных мостиков. Превышение нормальной внутриклеточной концентрации цистеина вследствие его восстановления из цистина или блокирования экспорта также опасно для клетки, так как вызывает рост АФК, а также активирует генотоксическую реакцию Фентона [2, 4]. Кроме того, в высокой концентрации цистеин может конкурировать с треонином за активный центр треониндеаминазы, первого фермента пути биосинтеза изолейцина [27]. Необходимо отметить, что повышение содержания цистина вследствие окислительного стресса также приводит к росту окисленной формы глутатиона GSSG. Известно, что фактор транскрипции Lrp реагирует на избыток цистеина и индуцирует AlaE, многофункциональный транспортер, который выкачивает цистеин из клетки до тех пор, пока не удастся снизить его уровень. Восстановление цистина и вывод цистеина из клетки существенно увеличивают потребность клеток в NADPH [27]. Таким образом, индуцированное нами усиление входа цистина увеличивает расход NADPH [27], а замедление выхода цистеина приводит к восстановлению железа и генотоксичности [4]. В обоих случаях наблюдается рост окисленной формы глутатиона (GSSG) (рис. 3), которая может непосредственно взаимодействовать с тиоловыми группами белков, вызывая их глутатионилирование [29]. Кроме того, снижение уровня NADPH приводит к активации глутатионилирования белков глутаредоксином [24, 29]. Также необходимо отметить, что для того, чтобы справиться с избытком цистина и цистеина, клетке необходимо расходовать АТФ, содержание которой в мутантах с делецией *gmhA* снижено в 2 раза [7]. Еще одним механизмом повышения чувствительности к антибиотикам в данном случае может быть нарушение окислительного фолдинга белков в периплазме *E. coli*. Таким образом, мы полагаем, что основной причиной возрастания чувствительности к антибиотикам штамма с делецией *gmhA* при росте уровня цистина и цистеина является истощение энергетических ресурсов клетки и редокс-модификации белков.

Внесение исследуемых мутаций приводит к снижению общего внутриклеточного пула тио-

лов, повышенного вследствие инактивации синтеза АДФ-гептозы в клетках с делецией *gmhA*. Это предсказуемый результат, обусловленный значительным снижением уровня цистеина и глутатиона в клетках, а нарушение транспорта цистина создает избыток окисленных форм, требующий NADPH, что снижает способность клетки восстанавливать тиоловые группы. Наибольший эффект достигается в случае делеции *cysE*. Кроме того, эта делеция полностью нивелирует возрастание продукции АФК, вызванное делецией *gmhA*, в то время как все остальные мутации в генах, регулирующих метаболизм цистеина и глутатиона, а также нарушение транспорта цистина приводят к еще большему повышению уровня АФК в клетках с делецией *gmhA*. Поскольку *O*-ацетилсерин – продукт реакции, катализируемой ацетилсерин-трансферазой, активирует регуляторный белок CysB, а также является интермедиатом в пути биосинтеза цистеина, то вполне объяснима более значительная супрессия эффекта делеции *gmhA* в клетках с $\Delta cysE$ по сравнению с $\Delta cysB$.

Таким образом, не выявлена корреляция цитотоксического действия антибиотиков с уровнем АФК, общим пулом тиолов или жизнеспособностью исходной популяции клеток. Однако обнаружена корреляция между ростом чувствительности к антибиотикам и повышением доли окисленного глутатиона (GSSG). В мутантах с большей чувствительностью к антибиотикам уровень GSSG выше, а в мутантах с пониженной чувствительностью ниже. Полученные данные свидетельствуют о том, что причиной снижения чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам является истощение пула низкомолекулярных тиолов, наблюдаемое при нарушении метаболизма цистеина и глутатиона, в то время как увеличение содержания цистина – окисленной формы цистеина, или цистеина, напротив, приводит к увеличению чувствительности данных клеток к антибиотикам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-30030).

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. **334**, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>
- Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornyykh 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**, 23565–53570. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007817117>
- Mironov A., Seregina T., Nagornyykh M., Luchachuk L.G., Korolkova N., Lopes L.E., Kotova V., Zavlinskyy G., Shakulov R., Shatalin K., Nudler E. (2017) Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, 6022–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703576114>
- Park S., Imlay J. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1942-1950.2003>
- Li X., Zhang T., Day N.J., Feng S., Gaffrey M.J., Qian W.-J. (2022) Defining the S-glutathionylation proteome by biochemical and mass spectrometric approaches. *Antioxidants* (Basel). **11**, 2272. <https://doi.org/10.3390/antiox11112272>
- Hillion M., Antelmann H. (2015) Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol. Chem.* **396**, 415–444. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0102>
- Seregina T.A., Petrushanko I.Yu., Shakulov R.S., Zari-pov P.I., Makarov A.A., Mitkevich V.A., Mironov A.S. (2022) The inactivation of LPS biosynthesis genes in *E. coli* cells leads to oxidative stress. *Cells*. **11**(17), 2667. <https://doi.org/10.3390/cells11172667>
- Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J., Lynn M.J., Sternberg P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 625–635. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00275-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00275-0)
- Jovanovic M.Z., Lilic M., Savic D.J., Jovanovic G.N. (2003) The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of HslJ transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol.* **149**(Pt 12), 3449–3459.
- Hindson V.J. (2003) Serine acetyltransferase of *Escherichia coli*: substrate specificity and feedback control by cysteine. *Biochem. J.* **375**, 745–752. <https://doi.org/10.1042/bj20030429>
- Chonoles Imlay K.R., Korshunov S., Imlay J.A. (2015) Physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**(23), 3629–3644. <https://doi.org/10.1128/jb.00277-15>
- Ohtsu I., Wiriyathanawudhiwong N., Morigasaki S., Nakatani T., Kadokura H., Takagi H. (2010) The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **285**, 17479–17487. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081356>
- Masip L., Veeravalli K., Georgiou G. (2006) The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 753–762. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.753>
- Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. **334**, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>
- Seregina T.A., Нагорных М.О., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Миронов А.С. (2018) Новая роль транскрипционного фактора CysB в деградации цистеина и образовании сероводорода в *E. coli*. *Генетика*. **54**(11), 1237–1244.
- Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornyykh 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.
https://doi.org/10.1073/pnas.2007817117
17. 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.
https://doi.org/10.1038/msb4100050
 18. Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab., ISBN 978-0-87969-106-6.
 19. 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.
https://doi.org/10.1073/pnas.120163297
 20. Kotova V.Yu., Manukhov I.V., Zavilgelskii G.B. (2010) Lux-biosensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress. *Appl. Biochem. Microbiol.* **46**, 781–788.
https://doi.org/10.1134/S0003683810080089
 21. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–3165.
https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378
 22. Ohtsu I., Kawano Y., Suzuki M., Morigasaki S., Saiki K., Yamazaki S., Nonaka G., Takagi H. (2015) Uptake of *L*-cystine via an ABC transporter contributes defense of oxidative stress in the *L*-cystine export-dependent manner in *Escherichia coli*. *PLoS One*. **10**, e0120619.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120619
 23. Yamazaki S., Takei K., Nonaka G. (2016) YdjN encodes an S-sulfocysteine transporter required by *Escherichia coli* for growth on S-sulfocysteine as a sulfur source. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw185.
https://doi.org/10.1093/femsle/fnw185
 24. Ulrich K., Jakob U. (2019) The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic. Biol. Med.* **140**, 14–27.
https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035
 25. McDonagh B., Pedrajas J.R., Padilla C.A., Bárcena J.A. (2013) Thiol redox sensitivity of two key enzymes of heme biosynthesis and pentose phosphate pathways: uroporphyrinogen decarboxylase and transketolase. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 932472.
https://doi.org/10.1155/2013/932472
 26. Sobota J.M., Imlay J.A. (2011) Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 5402–5407.
https://doi.org/10.1073/pnas.1100410108
 27. Korshunov S., Imlay K.R.C., Imlay J.A. (2020) Cystine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter. *Mol. Microbiol.* **113**, 22–39.
https://doi.org/10.1111/mmi.14403
 28. Reitzer L., DiRita V.J. (2015) Death by cystine: an adverse emergent property from a beneficial series of reactions. *J. Bacteriol.* **197**, 3626–3628.
https://doi.org/10.1128/JB.00546-15
 29. Mieyal J., Gallogly M., Qanungo S., Liedhegner E., Shelton M. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988.
https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089

Low-Molecular Thiols as a Factor Improving the Sensitivity of *Escherichia coli* Mutants with Impaired Synthesis ADP-Heptose to Antibiotics

T. A. Seregina¹*, I. Yu. Petrushanko¹**, P. I. Zaripov¹, Iu. D. Kuleshova¹, K. V. Lobanov¹, R. S. Shakulov¹, V. A. Mitkevich¹, A. A. Makarov¹, and A. S. Mironov¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

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

**e-mail: irina-pva@mail.ru

Low molecular weight thiols as glutathione and cysteine are an important part of the cell's redox regulation system. Previously, we have shown that inactivation of ADP-heptose synthesis in *Escherichia coli* during *gmhA* deletion induces the oxidative stress. It is accompanied by rearrangement of thiol homeostasis and increased sensitivity to antibiotics. In our study, we found that restriction of cysteine metabolism ($\Delta cysB$ and $\Delta cysE$) and inhibition of glutathione synthesis ($\Delta gshAB$) lead to a decrease in the sensitivity of the $\Delta gmhA$ mutant to antibiotics but not to its expected increase. At the same time, blocking of the export of cysteine ($\Delta eamA$) or increasing the of the import ($P_{tet}-tcyP$) into cells of oxidized form of cysteine -cystine leads to an even greater increase in the sensitivity of *gmhA*-deleted cells to antibiotics. In addition, there is no correlation between the cytotoxic effect of antibiotics and the level of reactive oxygen species (ROS), the total pool of thiols or the viability of the initial cell population. However, a correlation between the sensitivity to antibiotics and the level of oxidized glutathione in cells was found in our study. Apparently, a decrease in the content of low molecular weight thiols saves NADPH equivalents and limits the processes of protein redox modification. It leads to increasing of resistance of the $\Delta gmhA$ strain to antibiotics. On the contrary, an increase in low molecular weight thiols levels requires a greater expenditure of cell resources, leads to an increase in oxidized glutathione and induces to greater increase in sensitivity of the $\Delta gmhA$ strain to antibiotics.

Keywords: low molecular weight thiols, ADP-heptose synthesis, antibiotic sensitivity, glutathione, oxidative stress