

ФЕРМЕНТЫ БИОСИНТЕЗА ADP-ГЕПТОЗЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. Т. А. Серегина^{а, *}, И. Ю. Петрушанко^а, К. В. Лобанов^а,
Р. С. Шакулов^а, А. С. Миронов^а

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

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

Поступила в редакцию 20.05.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 31.05.2024 г.

Решение проблемы множественной лекарственной устойчивости требует нестандартных подходов, поскольку потенциал создания новых антибиотиков практически исчерпан. Управление метаболизмом патогена с целью повышения его восприимчивости к антибактериальной терапии рассматривается как наиболее перспективное направление создания новых комбинированных лекарственных средств. В последние годы возросло количество исследований, посвященных роли биосинтеза компонента клеточной стенки ADP-гептозы в чувствительности бактерий к антибиотикам, а также в патогенезе бактериальной инфекции. В настоящем обзоре рассмотрены основные направления исследований в области применения ADP-гептозы и ее аналогов в терапии бактериальных инфекций. Известна исключительная роль ADP-гептозы в индукции иммунного ответа через активацию сигнального пути NF-κB и синтезе провоспалительных цитокинов. В наших последних работах показано, что нарушение синтеза ADP-гептозы и оттока седогеппулозо-7-фосфата из пентозофосфатного пути индуцирует редокс-дисбаланс и полностью дезорганизует метаболизм низкомолекулярных тиолов, таких как сероводород, цистеин, глутатион, что делает бактериальную клетку чрезвычайно уязвимой к действию антибиотиков. Нами показано, что сверхчувствительность мутантов с нарушенным синтезом ADP-гептозы к широкому спектру антибиотиков объясняется скорее новым метаболическим статусом, чем изменением проницаемости клеточной стенки. Таким образом, потенциальные ингибиторы биосинтеза ADP-гептозы могут сочетать в себе такие положительные качества, как иммуномодулирующий эффект и мощное потенцирующее действие при проведении антибиотикотерапии.

Ключевые слова: грамотрицательные бактерии, антибиотики, синтез ADP-гептозы, окислительный стресс, редокс-статус клетки, ингибиторы ферментов биосинтеза ADP-гептозы, антимикробные адъюванты

DOI: 10.31857/S0026898424060048, **EDN:** HMZWNA

ВВЕДЕНИЕ

Появление все новых и новых противомикробных препаратов с последующим их широкомасштабным и бесконтрольным использованием как в клинической практике, так и в быту, привело к возникновению большого количества резистентных штаммов патогенных микроорганизмов, осложняющих хирургическое вмешательство и лечение таких социально значимых заболеваний, как туберкулез, венерические болезни, иммунодефицитные состояния [1]. Синтез антибиотиков новых поколений, обладающих альтернативной химической структурой, не позволяет решить проблемы, связанные с множественной лекарственной устойчивостью, поскольку их при-

менение неизбежно ведет к эволюции защитных механизмов бактериальной клетки: модификации ферментов-мишеней, изменению структуры клеточной стенки и систем транспорта антибиотика, активации процессов деградации молекул антибиотика [2]. В настоящее время практически полностью исчерпан спектр возможных механизмов действия веществ, обладающих потенциальной антибиотической активностью. Проблема антибиотикорезистентности требует принципиально нового подхода к ее решению. В последние годы появилось много публикаций, посвященных взаимосвязи метаболического статуса бактериальной клетки и ее чувствительности к антибактериальным препаратам [3–7]. Были открыты

новые неспецифические системы защиты бактерий от действия антибиотиков с участием низкомолекулярных тиолов, таких как сероводород [7–10]. Наиболее перспективным подходом к модулированию чувствительности микроорганизмов к антибиотику вне зависимости от механизма его действия, с нашей точки зрения, выглядит поиск наиболее уязвимых точек в центральном метаболизме бактериальной клетки, воздействуя на которые можно значительно повысить эффективность антибактериальной терапии. Создание нового поколения метаболических адъювантов, не обладающих собственным антибиотическим действием, но значительно усиливающих действие уже существующих препаратов, позволит продлить клиническое использование известных антибиотиков.

Пентозофосфатный путь (ПФП) — один из ключевых метаболических процессов, служащий источником пентозофосфатов для синтеза всех нуклеотидов и нуклеиновых кислот, в том числе и пиридинового нуклеотида NADPH, необходимого для роста клеток и их защиты от окислительного стресса. В каскаде превращений неокислительной ветви ПФП в клетках разных микроорганизмов синтезируется уникальный семиуглеродный сахар — седогептулозо-7-фосфат (С7Ф) — предшественник широкого спектра вторичных метаболитов, включая компоненты клеточной стенки и антибиотики, в частности аминогликозидные [11]. В клетках грамотрицательных бактерий С7Ф является предшественником активированной ADP-глицероманногептозы (ADP-гептозы), важного компонента липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки, соединяющего внутренний кор (2-кето-3-дезоксиктанат, КДО) с поверхностным О-антигеном (рис. 1) [12, 13].

Нарушение синтеза ADP-гептозы приводит к формированию шероховатых колоний (так называемый фенотип “deer rough”). Клетки с этим фенотипом характеризуются повышенной чувствительностью к различным гидрофобным соединениям, в том числе к антибиотикам новобиоцину, актиномицину D, эритромицину и др. [12, 16]. Ранее ферменты биосинтеза ADP-гептозы рассматривали как потенциальные мишени для противомикробных препаратов [17–20], но отсутствие структурных данных для ферментов-гомологов из разных видов патогенов существенно затрудняет исследования и подбор оптимальных химических структур ингибиторов. Инактивация генов ферментов биосинтеза ADP-гептозы не оказывает существенного влияния на скорость роста бактериальной культуры, однако заметно повышает чувствительность к широкому спектру антибиотиков [14], поэтому адъюванты на основе ингибиторов ферментов синтеза ADP-гептозы могут использоваться в качестве новых препаратов, усиливающих действие традиционных антибиотиков.

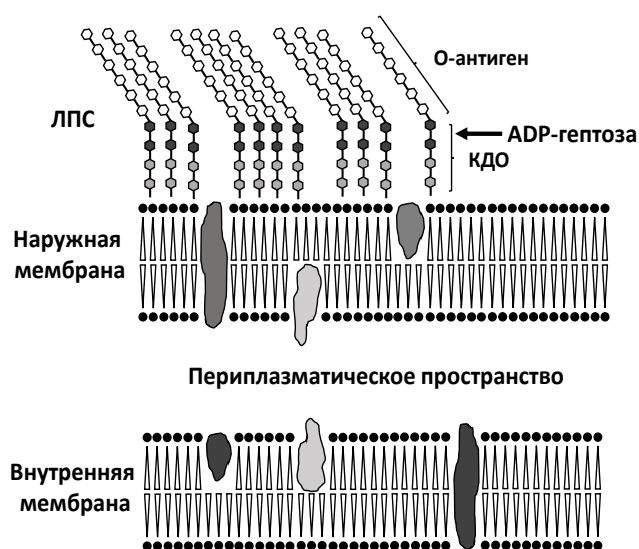


Рис. 1. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий [14, лицензия Creative Commons Attribution (CC BY)]. ADP-гептоза является связующим звеном между полисахаридными цепями О-антигена и внутренним ядром (КДО) [13]. Структура ЛПС-мутантов, утративших ADP-гептозу, нестабильна из-за отсутствия отрицательно заряженных фосфатных групп на гептозных остатках, которые в норме стабилизируют структуру за счет взаимодействия с положительно заряженными ионами. Кроме того, клеточная стенка мутантов, утративших ADP-гептозу, характеризуется повышенной проницаемостью для гидрофобных соединений [15].

БИОСИНТЕЗ ADP-ГЕПТОЗЫ: ФЕРМЕНТЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Предшественником активированной ADP-гептозы является семиуглеродный сахар С7Ф, синтезируемый в неокислительной ветви ПФП (рис. 2). Следует отметить, что образование С7Ф тесно связано с синтезом пентозофосфатов и их возвратом в гликолиз через неокислительную ветвь ПФП. Таким образом, нарушение оттока С7Ф может оказывать существенное влияние на метаболическое равновесие в ПФП.

У *Escherichia coli* гены, участвующие в синтезе и транслокации компонентов ЛПС, распределены по трем оперонам в локусе *rfa* (известном также, как *waa*), однако гены *gmhA*, *hldE* и *gmhB*, кодирующие ферменты (рис. 2), отвечающие за начальные этапы синтеза ADP-гептозы, в него не входят [21]. Седогептулозо-7-фосфатизомераза (*GmhA*) осуществляет первый этап превращения С7Ф в D-глицеро-D-манногептозо-7-фосфат. Экспрессия гена *gmhA* находится под положительным контролем ДНК-связывающего транскрипционного регулятора *OmpR* [22]. Регулон *ompR* представляет собой совокупность генов,

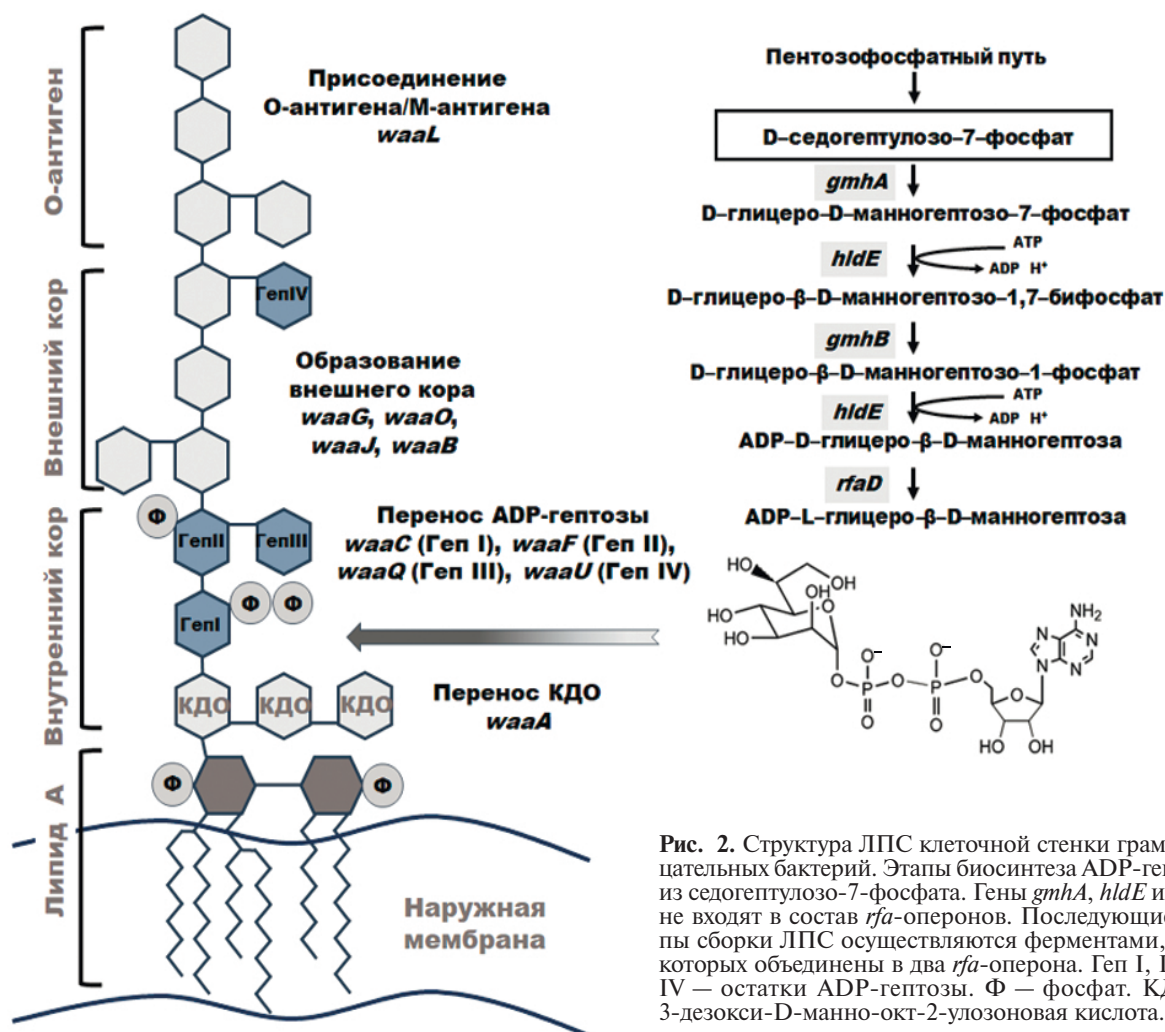


Рис. 2. Структура ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Этапы биосинтеза АДР-гептозы из седогептулозо-7-фосфата. Гены *gmhA*, *hldE* и *gmhB* не входят в состав *rfa*-оперонов. Последующие этапы сборки ЛПС осуществляются ферментами, гены которых объединены в два *rfa*-оперона. Геп I, II, III, IV — остатки АДР-гептозы. Ф — фосфат. КДО — 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улонозная кислота.

участвующих в ответе на так называемый “стресс оболочки” (envelope stress response) и кодирующих неспецифические транспортеры, такие как порины OmpF, OmpC, OmpA, OmpX, а также системы белков-переносчиков AcrAB-TolC, играющих роль в возникновении множественной лекарственной устойчивости [23]. Антагонистом OmpR является регулятор SrxR, который, в свою очередь, тормозит экспрессию генов, снижая тем самым уровень соответствующих белков-транспортеров в мембране клетки и ограничивая синтез ЛПС [24]. HldE представляет собой бифункциональный фермент, N-концевой домен которого является рибкиназой, присоединяющей фосфат в первом положении к D-глицеро-D-манногептозо-7-фосфату с образованием D-глицеро-D-манногептозо-1,7-бифосфата. Фосфат в седьмом положении отщепляет фосфатаза Gmh B. С-концевой домен HldE функционирует как нуклеотидсахартрансфераза и присоединяет АДР к D-глицеро-D-манногептозо-1-фосфату с образованием АДР-D-глицеро-β-D-манно-

гептозы. Регуляция экспрессии генов *hldE* и *gmhB* остается малоизученной.

Заключительный этап активации АДР-гептозы с последующим ее переносом на внутренний кор ЛПС осуществляется ферментами, гены которых объединены в первый *rfa*-оперон, состоящий из *rfaD* (или *gmhD*), *waaF* (или *rfaF*), *waaC* (или *rfaC*) и *waaL* (или *rfaL*). RfaD АДР-L-глицеро-D-манногептозо-6-эпимераза осуществляет превращение АДР-D-глицеро-β-D-манногептозы в АДР-L-глицеро-β-D-манногептозу. Гептозилтрансферазы I и II (WaaC и WaaF) переносят первый и второй остатки гептозы на КДО внутреннего кора ЛПС. Ген *waaL* кодирует лигазу, необходимую для прикрепления О-антигена или альтернативного М-антигена к внешнему кору ЛПС (рис. 2) [21]. Гены первого *rfa*-оперона находятся под положительным контролем двухкомпонентной системы ZraSR, включающей ZraS — мембраносвязанную сенсорную киназу, и ZraR — регулятор цитоплазматического ответа [25]. Роль системы Zra остается неопределен-

ной: она участвует в ответе на стресс, вызванный действием двухвалентных металлов (в частности, Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) [26], а также на стресс оболочки.

Второй оперон содержит гены *waaQ* (*rfaQ*) и *waaU* (*rfaK*), которые кодируют гептозилтрансферазы, добавляющие третий и четвертый остатки гептозы, соответственно (рис. 2), гены *waaG* (или *rfaG*), *waaO* (или *rfaI*) и *waaJ* (или *rfaJ*) кодируют глюкозилтрансферазы, участвующие в формировании наружного кора ЛПС из трех остатков глюкозы, *waaB* (*rfaB*) кодирует галактозилтрансферазу и добавляет остаток галактозы к первому остатку глюкозы наружного кора. Гены *waaY* (*rfaY*) и *waaP* (*rfaP*) кодируют киназы, ответственные за фосфорилирование гептоз, *waaZ* (*rfaZ*) участвует в прикреплении третьего остатка КДО во время биосинтеза ядра ЛПС и, наконец, ген *waaS* (*rfaS*), кодирует фермент, необходимый для прикрепления рамнозы к ядру ЛПС путем связывания с остатком КДО II [21]. Следует отметить, что наружный кор ЛПС не формируется при инактивации синтеза или транслокации гептозы, в результате возникает фенотип “deep rough”.

Короткий третий оперон *waa* содержит ген *waaA*, который кодирует трансферазу, добавляющую два остатка КДО к липиду А, и ген *coaD*, не участвующий в синтезе ЛПС [15, 27]. Определяющей особенностью ЛПС *E. coli* являются фосфорильные заместители в гептозных остатках ЛПС, необходимые для стабильности и структурной организации мембраны. Благодаря своим отрицательным зарядам, эти заместители обеспечивают соединение соседних молекул ЛПС, опосредованное двухвалентными катионами [28, 29].

РОЛЬ ADP-ГЕПТОЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Поверхность внешней мембраны грамотрицательных бактерий покрыта ЛПС, которые состоят из трех компонентов — липида А, олигосахаридов кора, обычно содержащих глюкозу, гептозу, галактозу, 2-кето-3-дезоксиктонат (КДО) и высоковариабельный компонент О-антигена [30]. ЛПС действует как барьер, защищающий от крупных молекул и гидрофобных соединений окружающей среды. Молекулы ЛПС интегрированы в фосфолипидный слой наружной мембраны, они поддерживают правильную структурную организацию таких белков, как порины, осуществляющие неспецифический транспорт малых молекул и выступающие в качестве рецепторов бактериофагов [31].

ЛПС грамотрицательных бактерий непроницаем для различных токсинов, протеаз, лизоцима, детергентов и гидрофобных антибактериальных соединений. Компоненты ЛПС,

высвобождающиеся в больших количествах при лизисе бактериальных клеток, по сути, являются эндотоксинами, вызывающими тяжелые осложнения бактериальных инфекций, в том числе сепсис. Недавно в опытах на *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* серовар *typhimurium*, птичьей патогенной *E. coli* (АРЕС) и *Campylobacter jejuni* установили, что длина ЛПС играет ключевую роль в способности возбудителей колонизировать кишечник, проникать в клетки хозяина, образовывать биопленки и в их подвижности [32–34]. Таким образом, ЛПС представляет собой фактор вирулентности, ответственный за патогенез бактериальной инфекции [35, 36]. Относительно недавно стали появляться данные о том, что ключевой промежуточный метаболит биосинтеза ЛПС, D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат, может активировать сигнальный путь транскрипционного регулятора NF-κB и индуцировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, запуская врожденный иммунный ответ [37, 38]. Обнаружено, что D-глицеро-β-D-манногептозо-1-фосфат (β-NMP) также может индуцировать TIFA-зависимую передачу сигналов NF-κB и воспалительный ответ, как и D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат [39]. Однако оставалось неясным, является ли D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат истинным патогенассоциированным молекулярным паттерном (pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Группа исследователей под руководством Шао показала, что ключевой промежуточный продукт биосинтеза ЛПС, ADP-гептоза, может транспортироваться в клетки млекопитающих и связываться с ALPK1 (альфа-киназой 1), что приводит к серии сильных иммунных реакций [40]. Предположили, что связывание ADP-гептозы с ALPK1 может вызвать конформационные изменения, которые приводят к фосфорилированию ее киназного домена и дальнейшей активации TIFA, что, в конечном итоге, активирует нижележащий путь NF-κB. Важно отметить, что в этой же работе показано, что D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфат не может действовать непосредственно как PAMP. Вместо этого аденилаттрансфераза хозяйской клетки превращает его в ADP-гептозо-7-фосфат, который активирует ALPK1 в меньшей степени, чем ADP-гептоза. Более того, инъекции ADP-гептозы вызывали у мышей сильные воспалительные реакции, в то время как инъекции D-глицеро-β-D-манногептозо-1,7-бисфосфата не оказывали заметного эффекта на продукцию медиаторов воспаления. Участие во взаимодействии ADP-гептозы, а не других интермедиатов гептозного пути подтверждено *in vitro* путем скрининга библиотеки мутантов транспозона *Y. pseudotuberculosis* [40]. Установлено, что инактивация *gmhA* и *hldE* пре-

пятствует активации пути NF- κ B, в то время как делеции *gmhB* и *rfaD* не влияли на активацию этого ядерного фактора [40]. Эти данные расширяют наши представления о бактериальных метаболитах как новом типе РАМР, обладающих большим потенциалом использования в разработке новых иммуномодуляторов и антивирулентных адъювантов.

РОЛЬ БИОСИНТЕЗА ADP-ГЕПТОЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА КЛЕТКИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

Согласно опубликованным данным, нарушение синтеза ADP-гептозы влечет за собой реорганизацию компонентов внешней мембраны клеточной стенки, приводя к изменению барьерной функции в сторону повышения проницаемости для гидрофобных соединений [41]. Однако метаболическим предшественником ADP-гептозы является С7Ф, образующийся в ПФП наряду с пентозофосфатами и генерацией восстановительных эквивалентов NADPH [42]. Таким образом, направление С7Ф из ПФП на синтез ЛПС может влиять на поддержание восстановительного потенциала NADPH и стрессоустойчивости бактериальной клетки в целом.

В наших работах мы сосредоточились на изучении фенотипа и метаболического статуса штаммов с инактивированными генами биосинтеза ADP-гептозы (*gmhA*, *hldE*, *gmhB*, *rfaD*), а также дефектным по генам транслоказ (*waaC* и *waaF*), отвечающих за формирование гептозного мостика, связывающего внутренний и внешний кор ЛПС (рис. 2). Штаммы $\Delta gmhA$, $\Delta hldE$, $\Delta rfaD$ и $\Delta waaC$ демонстрировали высокую чувствительность к широкому спектру антибиотиков и резкое изменение параметров центрального метаболизма (снижение пула NADPH, АТР, низкомолекулярных тиолов). Интересно, что мутант $\Delta waaF$ оказался значительно менее чувствительным к тестируемым антибиотикам, из чего следует, что добавление второго остатка гептозы к КДО, по-видимому, не имеет столь драматических последствий. Штамм с мутацией $\Delta gmhB$ практически не отличается от штамма дикого типа. Это связано с тем, что делеция гена *gmhB* не приводит к полному нарушению синтеза ADP-гептозы, поскольку клетки *E. coli* содержат гомологичные ферменты. Продукт гена *gmhB* (D-глицеро- β -D-манногептозо-1,7-бисфосфат-7-фосфатаза) представляет собой фермент, принадлежащий к подклассу фосфатаз. В клетках *E. coli* присутствует несколько подобных ферментов, например, имидазолглицеринфосфатдегидратаза/гистидинолфосфатаза HisB, участвующая в биосинтезе гистидина. Согласно опубликованным данным, активность

этих ферментов может компенсировать дефект делеции *gmhB* [20]. Кроме того, изменения редокс-статуса и других измеряемых параметров у этих мутантов ($\Delta waaF$, $\Delta gmhB$) были не столь значительными, как у штаммов с высокой чувствительностью к антибиотикам ($\Delta gmhA$, $\Delta hldE$, $\Delta rfaD$ и $\Delta waaC$).

Ранее мы показали, что инактивация генов *gmhA*, *hldE*, *rfaD* и *waaC* наряду с утратой ADP-гептозы провоцирует развитие мощного окислительного стресса, сопровождающегося нарушением гомеостаза низкомолекулярных тиолов, сероводорода, цистеина и глутатиона, которые играют важную роль в стрессоустойчивости клеток [7, 9, 43]. Ограничение метаболизма цистеина ($\Delta cysB$ и $\Delta cysE$) и ингибирование синтеза глутатиона ($\Delta gshAB$) влияют на редокс-статус исследуемых мутантов и приводят не к ожидаемому повышению, а к снижению чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам. В то же время блокирование экспорта цистеина ($\Delta eamA$) или увеличение импорта ($P_{tet-tyrP}$) цистина, являющего окисленной формой цистеина, приводит к еще большей чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам [43]. Выявлена корреляция между ростом чувствительности к антибиотикам и повышением доли окисленного глутатиона (GSSG) [44]. Снижение пула восстановительных эквивалентов NADPH в мутантах, утративших ADP-гептозу, ведет к возрастанию уровня окисленного глутатиона и редокс-модификации белков, следствием чего может стать изменение метаболического статуса клетки [44]. Таким образом, установлено, что весь метаболизм низкомолекулярных тиолов в “deep rough” мутантах направлен на обеспечение глутатионирования белков [45], которое не только защищает белки от необратимого окисления, но и может существенно изменять их функционирование [46]. В ходе проведенных исследований обнаружено, что чувствительность мутантов $\Delta gmhA$, утративших ADP-гептозу, может быть супрессирована активацией биосинтеза пуринов (рис. 3). Оказалось, что конститутивная экспрессия генов *purR*-регулона, включая серин-глициновый путь (рис. 3), приводит к супрессии чувствительности к антибиотикам и окислителям, а также к нормализации пула восстановительных эквивалентов NADPH, активности системы SoxRS защиты от окислительного стресса и к снижению уровня окислительной модификации белков [44].

Нам удалось показать, что высокую чувствительность “deep-rough” мутантов нельзя объяснить исключительно нарушением барьерной функции ЛПС. Наибольшую чувствительность к антибиотикам и изменения в центральном

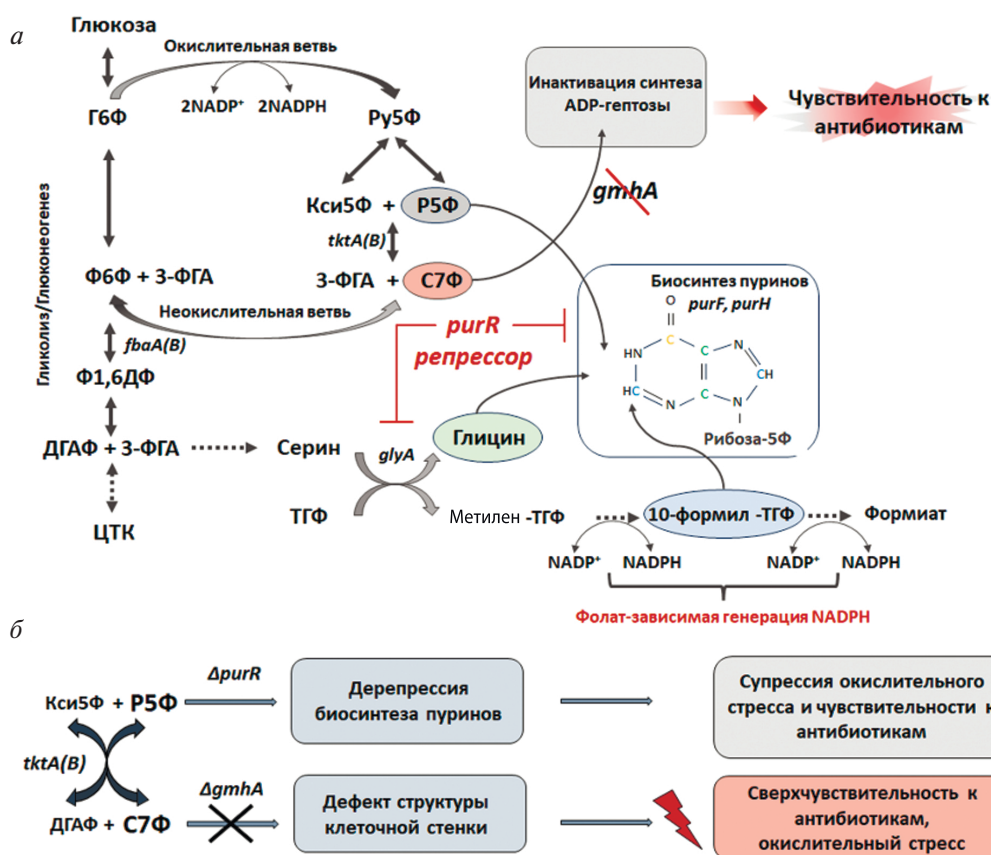


Рис. 3. Биосинтез пуринов как фактор, модулирующий чувствительность мутантов по ADP-гептозе. *а* – Метаболическая схема пентозофосфатного пути, показывающая взаимосвязь процессов синтеза предшественника ADP-гептозы – седогептулозо-7-фосфата, рибозо-5-фосфата и восстановления NADPH. Репрессор PurR регулирует синтез пуринов, начиная с образования фосфорибозилпирофосфата, а также серин-глициновый путь (ген *glyA*), который наряду с окислительной ветвью пентозофосфатного пути является источником генерации NADPH. *б* – Инактивация синтеза ADP-гептозы приводит к фенотипу “deer rough”, гиперчувствительности к антибиотикам и окислительному стрессу. Активация биосинтеза пуринов в бактериальных клетках с нарушенным синтезом ADP-гептозы подавляет чувствительность к антибиотикам и окислительный стресс [44], лицензия Creative Commons Attribution (CC BY). Г6Ф – глюкозо-6-фосфат, Ф6Ф – фруктозо-6-фосфат, 3-ФГА – глицеральдегид-3-фосфат, Ф1,6ДФ – фруктозо-1,6-ди-фосфат, ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат, Ру5Ф – рибулозо-5-фосфат, Р5Ф – рибозо-5-фосфат, Кси5Ф – ксило-зо-5-фосфат, С7Ф – седогептулозо-7-фосфат, ТГФ – тетрагидрофолат, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

метаболизме демонстрировали мутанты по генам биосинтеза (*gmhA*, *hldE*, *rfaD*) и мутант по транслоказе первого остатка гептозы (*waaC*). Нарушение синтеза ADP-гептозы, по-видимому, провоцирует усиление центрального метаболизма, включая цикл трикарбоновых кислот. На фоне делеции *gmhA* существенно возрастает уровень редокс-чувствительной глюконеогенной альдозазы FbaB [44]. Изменение активности ферментов путем глутатионирования играет важную роль в регуляции биосинтетических процессов [47]. Увеличение активности альдозазы FbaB у мутантов *gmhA* на фоне повышенного уровня глутатионирования белков свидетельствует о значительном перераспределении центральных метаболических потоков.

СОЗДАНИЕ ИНГИБИТОРОВ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА ADP-ГЕПТОЗЫ

Ферменты биосинтеза ADP-гептозы давно вызывают интерес в качестве мишеней для создания адьювантов, повышающих эффективность антибактериальной терапии [17, 19, 20, 48]. Следует отметить, что у клинически значимых грамотрицательных микроорганизмов ферменты биосинтеза ADP-гептозы обладают высокой степенью гомологии [18, 20]. Однако создать клинически значимые, эффективные, биодоступные ингибиторы до сих пор не удалось, что, по-видимому, связано с недостатком данных о структуре этих ферментов у различных патогенов. Сами ингибиторы биосинтеза ADP-гептозы не долж-

ны обладать противомикробной активностью, поскольку инактивация генов этого биосинтетического пути не влияет существенно на скорость роста бактериальной культуры [14] и позволяет избежать появления новых резистентных форм в процессе их клинического и бытового использования.

Известны попытки создания ингибиторов первых двух ферментов биосинтеза ADP-гептозы (GmhA и HldE) на основе аналогов D-глицеро-D-манногептозо-7-фосфата. Обнаружено, что GmhA и HldE чрезвычайно чувствительны к структурным модификациям в положениях 6 и 7 гептозного каркаса. Эпимерный аналог гептозо-7-фосфата, имеющий конфигурацию D-глюкопиранозы, оказался лучшим ингибитором обоих ферментов, но также и единственной молекулой этого ряда, которая могла ингибировать GmhA ($IC_{50} = 34$ мкМ) и HldE ($IC_{50} = 9.4$ мкМ) в микромолярном диапазоне концентраций [19]. Еще одной попыткой стала работа, посвященная изучению ингибирующей активности ряда фосфорил- и фосфонилзамещенных производных, содержащих гидроксаматный фрагмент, рибозы или гексозы, направленных на связывание иона Zn^{2+} в активном сайте фермента GmhA. Некоторые из этих соединений оказались наномолярными ингибиторами GmhA. Они лишены цитотоксичности в отношении клеток гепатокарциномы HepG2 и собственной антибактериальной активности, но при этом предотвращают гептозилирование ЛПС *in vitro* у Enterobacteriaceae, а также усиливают действие эритромицина и рифампицина на клетки *E. coli* дикого типа [48]. Результатом высокопроизводительного скрининга (HTS) 40000 соединений из внутренней библиотеки MutaBilis с использованием люминесцентного анализа HldE-киназной активности *E. coli* стало открытие ингибиторов 1 и 2 с IC_{50} в диапазоне 50–70 мкМ. Показано, что эти соединения являются конкурентоспособными и обратимыми ингибиторами по отношению к АТР в реакции, катализируемой киназой HldE. Исследование взаимосвязи структуры и активности соединений этого ряда привело к значительному улучшению эффективности соединения 5х, имеющего $IC_{50} = 0.11$ мкМ [18]. Соединения этого ряда были также способны ингибировать HldA *Neisseria meningitidis*, гомолог киназного домена HldE *E. coli*, но полностью неактивны в отношении рибокиназы *E. coli*. Учитывая сходство между HldE *E. coli* и HldA *N. meningitidis*, соединения этой серии, скорее всего, селективны в отношении HldE/HldA грамтрицательных бактерий [18]. В качестве возможных мишеней для создания ингибиторов рассматривали также гептозилтрансферазы I и II (WaaC и WaaF) [48]. Особенно интересным представляется обнаружение ингибирующего эффекта аминоглизидных антибиотиков на эти ферменты. Экспериментально подтверждено, что несколько аминоглизидов это первые в своем классе наномолярные ингибиторы гептозилтрансфераз, причем у лучшего ингибитора величина $K_i = 600 \pm 90$ нМ [49]. Таким

образом, ингибирование рибосомы не является единственным и основным механизмом действия аминоглизидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные данные свидетельствуют о том, что ADP-гептоза представляет собой уникальный фактор вирулентности грамтрицательных патогенов, обладающий иммуномодулирующими свойствами. Терапия инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных в группу ESKAPE (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*), зачастую требует применения высокотоксичного антибиотика — колистина, мишенью которого является липид А [50]. Комбинированная терапия ацинетобактерной (*A. baumannii*) инфекции колистином в сочетании с дорипиномом снижала уровень трех метаболитов ПФП, а именно С7Ф, D-рибозо-5-фосфата и D-эритрозо-4-фосфата [51]. Результаты упомянутых исследований показывают, что эти антибиотики мешают биосинтезу ADP-гептозы у *A. baumannii* путем ингибирования ПФП. Нами показано, что инактивация синтеза ADP-гептозы в клетках *E. coli* влечет за собой кардинальную перестройку центрального метаболизма, в том числе ПФП, приводя к снижению восстановительных эквивалентов NADPH и уровня АТР, необходимых для осуществления анаболических процессов при росте и делении. Кроме того, клетки, утратившие ADP-гептозу, не способны генерировать сероводород, важный антибиотикопротективный фактор [14]. Блокирование пути биосинтеза ADP-гептозы провоцирует развитие мощного окислительного стресса, сопровождающегося полной дезорганизацией метаболизма тиолов, выражающейся в тотальном глутатионилировании белков и изменении активности редокс-зависимых ферментов центрального метаболизма [43]. Таким образом, ферменты биосинтеза ADP-гептозы представляют собой перспективные мишени для создания антивирулентных адъювантов, обладающих как иммуномодулирующими, так и потенцирующими действие антибиотиков свойствами. Следует отметить, что несмотря на высокую гомологию ферментов данного метаболического пути у грамтрицательных бактерий, еще недостаточно структурных данных для создания высокоселективных и нетоксичных ингибиторов, что представляется важным направлением дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность Е.А. Нудлеру, В.А. Митькевичу 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 работа выполнена без использования людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bharadwaj A., Rastogi A., Pandey S., Gupta S., Sohal J.S. (2022) Multidrug-resistant bacteria: their mechanism of action and prophylaxis. *BioMed. Res. Int.* **2022**, 5419874. <https://doi.org/10.1155/2022/5419874>
2. Darby E.M., Trampari E., Siasat P., Gaya M.S., Alav I., Webber M.A., Blair J.M.A. (2023) Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
3. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
4. Lobritz M.A., Belenky P., Porter C.B.M., Gutierrez A., Yang J.H., Schwarz E.G., Dwyer D.J., Khalil A.S., Collins J.J. (2015) Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 8173–8180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509743112>
5. Dwyer D.J., Belenky P.A., Yang J.H., MacDonald I.C., Martell J.D., Takahashi N., Chan C.T., Lobritz M.A., Braff D., Schwarz E.G., Ye J.D., Pati M., Vercruysse M., Ralifo P.S., Allison K.R., Khalil A.S., Ting A.Y., Walker G.C., Collins J.J. (2014) Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, E2100–E2109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111>
6. Stokes J.M., Lopatkin A.J., Lobritz M.A., Collins J.J. (2019) Bacterial metabolism and antibiotic efficacy. *Cell Metabolism.* **30**, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.009>
7. 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>
8. Mironov A., Seregina T., Nagornyykh M., Luhachack L., Korolkova L., Errais Lopes L., Kotova V., Zavlilgelsky G., Shakulov R., Shatalin R., Nudler E. (2017) A mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 6022–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703576114>
9. 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>
10. Серегина Т., Лобанов К., Шакулов Р., Миронов А. (2022) Повышение бактерицидного эффекта антибиотиков путем ингибирования ферментов, вовлеченных в генерацию сероводорода у бактерий. *Молекуляр. биология.* **57**, 697–709.
11. Sprenger G.A. (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **164**, 324–330. <https://doi.org/10.1007/BF02529978>
12. Kneidinger B., Marolda C., Graninger M., Zamyatina A., McArthur F., Kosma P., Valvano M.A., Messner P. (2002) Biosynthesis pathway of ADP-l-glycero-β-D-manno-heptose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 363–369. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.363-369.2002>
13. Huang K.C., Mukhopadhyay R., Wen B., Gitai Z., Wingreen N.S. (2008) Cell shape and cell-wall organization in gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 19282–19287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805309105>
14. Seregina T.A., Petrushanko I.Yu., Shakulov R.S., Zaripov 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**. <https://doi.org/10.3390/cells11172667>
15. Schnaitman C.A., Klena J.D. (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 655–682. <https://doi.org/10.1128/mr.57.3.655-682.1993>
16. Taylor P.L., Blakely K.M., de Leon G.P., Walker J.R., McArthur F., Evdokimova E., Zhang K., Valvano M.A., Wright G.D., Junop M.S. (2008) Structure and function of sedoheptulose-7-phosphate isomerase, a critical enzyme for lipopolysaccharide biosynthesis and a target for antibiotic adjuvants. *J. Biol. Chem.* **283**, 2835–2845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706163200>
17. Desroy N., Denis A., Oliveira C., Atamanyuk D., Briet S., Faivre F., LeFralliec G., Bonvin Y., Oxoby M., Escaich S., Floquet S., Drocourt E., Vongsouthi V., Durant L., Moreau F., Verhey T.B., Lee T.W., Junop M.S., Gerusz V. (2013) Novel HldE-K inhibitors leading to attenuated gram negative bacterial virulence. *J. Med. Chem.* **56**, 1418–1430. <https://doi.org/10.1021/jm301499r>
18. Desroy N., Moreau F., Briet S., Fralliec G.L., Floquet S., Durant L., Vongsouthi V., Gerusz V., Denis A., Escaich S. (2009) Towards gram-negative antivirulence drugs: new inhibitors of HldE kinase. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1276–1289. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.12.021>
19. Durka M., Tikad A., Périon R., Bosco M., Andalousi M., Floquet S., Malacain E., Moreau F., Oxoby M., Gerusz V., Vincent S.P. (2011) Systematic synthesis of inhibitors of the two first enzymes of the bacterial heptose biosynthetic pathway: towards antivirulence molecules targeting lipopolysaccharide biosynthesis. *Chemistry.* **17**, 11305–11313. <https://doi.org/10.1002/chem.201100396>

20. Valvano M.A. (1999) Biosynthesis and genetics of ADP-heptose. *J. Endotoxin Res.* **5**, 90–95.
<https://doi.org/10.1177/09680519990050010901>
21. Pagnout C., Sohm B., Razafitianamaharavo A., Caillet C., Offroy M., Leduc M., Gendre H., Jomini S., Beaussart A., Bauda P., Duval J.F.L. (2019) Pleiotropic effects of rfa-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Sci. Rep.* **9**, 9696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46100-3>
22. Shimada T., Takada, H., Yamamoto K., Ishihama A. (2015) Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets. *Genes to Cells.* **20**, 915–931.
<https://doi.org/10.1111/gtc.12282>
23. Fu D., Wu J., Gu Y., Li Q., Shao Y., Feng H., Song X., Tu J., Qi K. (2022) The response regulator OmpR contributes to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Poultry Sci.* **101**, 101757.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101757>
24. Jubelin G., Vianney A., Beloin C., Ghigo J.M., Lazzaroni J.C., Lejeune P., Dorel C. (2005) CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 2038–2049.
<https://doi.org/10.1128/jb.187.6.2038-2049.2005>
25. Rome K., Borde C., Taher R., Cayron J., Lesterlin C., Gueguen E., De Rosny E., Rodrigue A. (2018) The two-component system ZraPSR is a novel ESR that contributes to intrinsic antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **430**, 4971–4985.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>
26. Leonhartsberger S., Huber A., Lottspeich F., Böck A. (2001) The *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J. Mol. Biol.* **307**, 93–105.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4451>
27. Wang X., Quinn P.J. (2010) Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Progress Lipid Res.* **49**, 97–107.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002>
28. Nikaido H., Vaara M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1–32.
<https://doi.org/10.1128/mr.49.1.1-32.1985>
29. Yethon J.A., Vinogradov E., Perry M.B., Whitfield C. (2000) Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waag* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J. Bacteriol.* **182**, 5620–5623.
<https://doi.org/10.1128/jb.182.19.5620-5623.2000>
30. Beveridge T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733.
<https://doi.org/10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999>
31. Achouak W., Heulin T., Pagès J.M. (2001) Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 1–7.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x>
32. Nickerson K.P., Chanin R.B., Sistrunk J.R., Rasko D.A., Fink P.J., Barry E.M., Nataro J.P., Faherty C.S. (2017) Analysis of *Shigella flexneri* resistance, biofilm formation, and transcriptional profile in response to bile salts. *Infect. Immun.* **85**, 1–18.
<https://doi.org/10.1128/iai.01067-16>
33. Mohammed Jajere S.A (2019) Review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World.* **12**, 504–521.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
34. Joseph J., Zhang L., Adhikari P., Evans J.D., Ramachandran R. (2023) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in broiler breeders: an overview. *Pathogens.* **12**.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12111280>
35. Matsuura M. (2013) Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front. Immunol.* **4**, 109.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00109>
36. Zhao Y., Shao F. (2015) Diverse mechanisms for inflammasome sensing of cytosolic bacteria and bacterial virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **29**, 37–42.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.003>
37. Hu X.Y., Yang C., Wang P., Zhang G.L. (2018) ADP-heptose: a new innate immune modulator. *Carbohydrate Res.* **473**.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.12.011>
38. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Targeted Therapy.* **2**, 17023.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
39. Adekoya I.A., Guo C.X., Gray-Owen S.D., Cox A.D., Sauvageau J. (2018) D-glycero- β -D-mannoheptose 1-phosphate and D-glycero- β -D-mannoheptose 1,7-biphosphate are both innate immune agonists. *J. Immunol.* **201**, 2385–2391.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801012>
40. Zhou P., She Y., Dong N., Li P., He H., Borio A., Wu Q., Lu S., Ding X., Cao Y., Xu Y., Gao W., Dong M., Ding J., Wang D.C., Zamyatina A., Shao F. (2018) Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose. *Nature.* **561**, 122–126.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0433-3>
41. Pagnout C., Sohm B., Razafitianamaharavo A., Caillet C., Offroy M., Leduc M., Gendre H., Jomini S., Beaussart A., Bauda P., Duval J.F.L. (2019) Pleiotropic effects of rfa-gene mutations on *Escherichia coli* envelope properties. *Sci. Rep.* **9**, 9696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46100-3>
42. Krüger A., Grüning N.M., Wamelink M.M., Kerick M., Kirpy A., Parkhomchuk D., Bluemlein K., Schweiger M.R., Soldatov A., Lehrach H., Jakobs C., Ralser M. (2011) The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxidants & Redox Signal.* **15**, 311–324.

- <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3797>
43. Серегина Т.А., Петрушанко И.Ю., Зарипов П.И., Кулешова Ю.Д., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Миткевич В.А., Макаров А.А., Миронов А.С. (2023) Низкомолекулярные тиолы как фактор, усиливающий чувствительность мутантов *Escherichia coli* с нарушенным синтезом ADP-гептозы к антибиотикам. *Молекуляр. биология*. **57**, 995–1005.
 44. Seregina T.A., Petrushanko I.Yu., Zaripov P.I., Shaku-
lov R.S., Sklyarova A.S., Mitkevich V.A., Makarov
A.A., Mironov A.S. (2023) Activation of purine bio-
synthesis suppresses the sensitivity of *E. coli GmhA* mu-
tant to antibiotics. *Int. J. Mol. Sci.* **24**.
<https://doi.org/10.3390/ijms242216070>
 45. Mieyal J.J., Chock P.B. (2012) Posttranslational
modification of cysteine in redox signaling and oxidative
stress: focus on S-glutathionylation. *Antioxid. Redox
Signal.* **16**, 471–475.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4454>
 46. Chai Y.C., Mieyal J. (2023) Glutathione and glutaredoxin –
key players in cellular redox homeostasis and signaling.
Antioxidants. **12**, 1553.
<https://doi.org/10.3390/antiox12081553>
 47. Xiong Y., Uys J.D., Tew K.D., Townsend D.M. (2011)
S-glutathionylation: from molecular mechanisms to
health outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 233–270.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3540>
 48. Moreau F., Desroy N., Genevard J.M., Vongsouthi V.,
Gerusz V., Le Fralliec G., Oliveira C., Floquet S., Denis A.,
Escaich S., Wolf K., Busemann M., Aschenbrenner A.
(2008) Discovery of new gram-negative antivirulence
drugs: structure and properties of novel *E. coli* WaaC
inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4022–4026.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.117>
 49. Milicaj J., Hassan B.A., Cote J.M., Ramirez-Mondragon
C.A., Jaunbocus N., Rafalowski A., Patel K.R.,
Castro C.D., Muthyala R., Sham Y.Y., Taylor E.A.
(2022) Discovery of first-in-class nanomolar inhibitors of
heptosyltransferase I reveals a new aminoglycoside target
and potential alternative mechanism of action. *Sci. Rep.*
12, 7302.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-10776-x>
 50. Velkov T., Roberts K., Nation R., Thompson P., Li J.
(2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into
an 'old class of antibiotics. *Future Microbiol.* **8**, 711–724.
<https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>
 51. Mahamad Maifiah M., Creek D., Nation R., Forrest A.,
Tsuji B., Velkov T., Li J. (2017) Untargeted metabolomics
analysis reveals key pathways responsible for the synergistic
killing of colistin and doripenem combination against
Acinetobacter baumannii. *Sci. Rep.* **7**, 45527.
<https://doi.org/10.1038/srep45527>

Enzymes of ADP-Heptose Biosynthesis as Targets for the Creation of Broad-Spectrum Antibacterial Drugs

T. A. Seregina^{1,*}, I. Yu. Petrushanko¹, K. V. Lobanov¹,
R. S. Shakulov¹, A. S. Mironov¹

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

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

Solving the problem of multidrug resistance currently requires the development of non-standard approaches, since the potential for creating new antibiotics is almost exhausted. Controlling the metabolism of a pathogen in order to increase its susceptibility to antibacterial therapy is considered the most promising area of research for the creation of new combination drugs. In recent years, the number of studies devoted to investigation the role of the biosynthesis of the cell wall component ADP-heptose in the sensitivity of bacteria to antibiotics, as well as in the pathogenesis of bacterial infection, has increased. This review examines the main directions of scientific research in the field of use of ADP-heptose and its analogues in the treatment of bacterial infections. The exclusive role of ADP-heptose in the induction of an immune response is known, through the activation of the NF- κ B signaling pathway and the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Our latest work has shown that disruption of the synthesis of ADP-heptose and the efflux of sedoheptulose-7-phosphate from the pentose phosphate pathway induces a redox imbalance and completely disorganizes the metabolism of low molecular weight thiols such as hydrogen sulfide, cysteine, glutathione, which makes the bacterial cell extremely vulnerable to the action of antibiotics. We demonstrate that the hypersensitivity of ADP-heptose mutants to a wide range of antibiotics is explained by a new metabolic status rather than by changes in cell wall permeability. Thus, potential inhibitors of ADP-heptose biosynthesis can combine several positive qualities: an immunomodulatory effect and a powerful potentiating effect in combination with antibiotic therapy.

Keywords: Gram-negative bacteria, antibiotics, ADP-heptose synthesis, oxidative stress, cell redox status, inhibitors of ADP-heptose biosynthesis enzymes, antimicrobial adjuvants