

# ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

“Журнал НАМН України”, 2013, т. 19, № 2. — С. 162-170.

УДК 579.252.58:615.015.8(045)

Ю. Л. Волянский, Т. Ю. Колотова, И. Ю. Кучма\*

Государственное учреждение “Институт микробиологии и иммунологии  
им. И. И. Мечникова НАМН Украины”, 61057 Харьков

\*Харьковская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины, 61057 Харьков

## SOS В ПРЯМОМ И ПЕРЕНОСНОМ СМЫСЛЕ. НОВАЯ СТРАТЕГИЯ БОРЬБЫ С РАЗВИТИЕМ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ (обзор литературы)

(Представлено академиком НАН и НАМН Украины В. П. Широковым)

Клиническая устойчивость к антибиотикам развивается очень быстро. Формируются устойчивые варианты за счет мутаций, перестроек генома и горизонтального переноса генов. Согласно общепринятым взглядам теории эволюции, изменения генома возникают случайно, постоянно, с одинаковой скоростью и в любой точке генома; поэтому вмешательство в процесс формирования антибиотикоустойчивости невозможно. Однако в последнее время такие взгляды на природу генетической изменчивости подвергаются пересмотру. Так, показано, что существуют молекулярные механизмы, локализирующие образование мутаций, перестройки и процессы горизонтального переноса генов во времени и в пространстве генома. Активируются механизмы изменчивости в стрессовых условиях, в том числе при встрече с антибиотиками. Бактериальные клетки обладают такими программами ответа на стрессовые факторы, как SOS-ответ и общий ответ на стресс, зависящий от *RpoS*-регулона. Активация обеих программ временно ускоряет мутагенез, а SOS-ответ — рекомбинацию и горизонтальный перенос генов. Образование мутаций увеличивается во временно формируемых процессом транскрипции горячих точках. Ингибиторы, подавляющие индукцию механизмов изменчивости, а также непосредственно ферментов, участвующих в создании генетических вариантов, могут существенно замедлить развитие устойчивости к антибиотикам. Поэтому представляется актуальным поиск таких ингибиторов, которые бы подавляли развитие устойчивости микробов к антибиотикам.

**Ключевые слова:** антибиотики, антибиотикорезистентность, фторхинолоны, SOS-ответ, мутагенез, горизонтальный перенос генов, интегроны, плазмиды, трансформация, *RecA*, *RpoS*-регулон, *mfd*, ингибиторы *RecA*.

Когда были открыты антибиотики, микробиологи считали, что вероятность возникновения устойчивости к ним ничтожно мала, поскольку скорость вызывающих резистентность мутаций, выявленная в эксперименте, очень низкая [7]. Однако на практике все произошло иначе. В настоящее время нет

ни одного антибиотика, к которому не выработалась бы резистентность.

Теоретической основой формирования устойчивости к антибиотикам являются представления синтетической теории эволюции о случайности мутаций. Такие взгляды в значительной мере ос-

ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины”

Ю. Л. Волянский — директор института, д.м.н., профессор (imidir@ukr.net)

Т. Ю. Колотова — с.н.с. лаборатории клинической иммунологии и аллергологии

Харьковская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины

И. Ю. Кучма — профессор кафедры клинической иммунологии и микробиологии, к.м.н.

© Ю. Л. Волянский, Т. Ю. Колотова, И. Ю. Кучма, 2013.

нованы на опытах С. Лурия и М. Дельбрюка, проведенных в середине прошлого века [28]. В свое время поставленные ими опыты позволили сделать выбор между двумя предположениями о происхождении вариантов кишечной палочки, устойчивых к бактериофагу. Согласно первой точке зрения, устойчивость индуцируется самим бактериофагом. Согласно второй точке зрения, еще до воздействия бактериофага на культуру в ней уже существует небольшое количество устойчивых клеток. Мутанты спонтанно возникают при делении клеток в результате ошибок ДНК полимеразы или действия мутагенов. При посеве бактерий на агар, содержащий фаг, происходит не индукция устойчивости, а отбор устойчивых вариантов. Эти две точки зрения приводили к разным предсказаниям по отношению к статистическим закономерностям появления устойчивых колоний. Так, в случае индукции количество мутантных устойчивых колоний в каждой чашке незначительно отличается от среднего количества колоний, подсчитанных на всех чашках с агаром. В то же время, при случайном появлении мутантных вариаций ожидаются значительные флуктуации количества устойчивых к бактериофагу колоний на чашках. В опытах С. Лурия и М. Дельбрюка наблюдались очень большие флуктуации количества колоний устойчивых бактерий в индивидуальных культурах. Полученные данные убедительно подтверждали возникновение устойчивых вариантов еще до столкновения с фагом: большие флуктуации свидетельствовали против гипотезы индуцированной устойчивости, дисперсия при которой должна быть небольшой. Однако в их экспериментах созданы очень жесткие селективные условия для бактерий, и все нерезистентные клетки быстро погибают, не успевая ответить на вызов среды до того как смогут приобрести необходимые мутации или эпигенетические изменения [36]. Результаты опытов подтверждают, что некоторые мутации происходят до селекции, однако не доказывают, что в стрессовых условиях новые варианты устойчивости не появляются.

Недавно удалось вне организма частично воспроизвести гетерогенность условий, с которыми сталкиваются бактерии при действии антибиотиков в организме [45]. Ученым удалось создать градиент концентрации антибиотика и пронаблюдать, что же происходит в условиях, приближенных к реально существующим: появляются ли мутации *de novo* или происходит отбор уже существующих устойчивых вариантов? В случае внесения бактерий в среду, в которой не создавался градиент концентраций ципрофлоксацина, устойчивые варианты не были обнаружены. Однако при

внесении в среду со сформированным градиентом концентрации антибиотика  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  и даже 100 бактерий возникали резистентные варианты. Эти данные однозначно свидетельствуют о возникновении мутаций *de novo* после столкновения с антибиотиком. Для возникновения устойчивых вариантов при внесении  $10^6$  бактерий требовалось всего 10 часов. При внесении меньшего количества бактерий время, необходимое для формирования устойчивости, увеличивалось. Однако даже при внесении минимального количества бактерий устойчивые варианты появлялись приблизительно через 30 ч. Эксперимент с внесением  $10^6$  клеток повторяли три раза, а затем секвенировали геномы устойчивых вариантов. Во всех трех случаях обнаружили четыре одинаковые мутации в генах, необходимых для формирования резистентности к антибиотику, а фиксировались они в популяции уже через 10 ч.

Данные вышеизложенных экспериментов показывают, что мутации могут возникать после столкновения бактерий с антибиотиками в условиях, приближенных к реальным, очень быстро и закономерно. На вопрос, индуцируется ли появление адаптивных мутаций или происходит отбор случайно возникающих мутаций, проведенные исследования точного ответа не дают. Хотя представляется крайне маловероятным, чтобы четыре одинаковые мутации были отобраны в разных популяциях в течение очень короткого времени.

Как уже отмечалось, представления о механизмах формирования устойчивости к антибиотикам основаны на экспериментах С. Лурия и М. Дельбрюка и классических положениях синтетической теории эволюции. Мутации возникают до столкновения бактерий с антибиотиком и с одинаковой скоростью. Повлиять же на скорость их появления невозможно. В свою очередь, мутации — это неизбежный результат ошибок ДНК полимеразы, возникающих при репликации ДНК, репарации повреждений ДНК или действии мутагенов. По нашему мнению, такой взгляд существенно препятствует поиску новых методов лечения инфекций, хотя ситуация не столь безнадежна. Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о существовании особых механизмов, активирующихся в стрессовых условиях и увеличивающих скорость мутагенеза [1, 12].

Известно, что субингибирующие концентрации некоторых антибиотиков увеличивают частоту мутаций бактерий [14, 43]. Так, мутагенность фторхинолонов впервые была показана в тесте Эймса для *S. typhimurium* [38], а затем и для ряда других бактерий [10]. Ципрофлоксацин повышает частоту мутагенеза *S. aureus* [11] и *M. fortuitum* [13]. Более

того, ципрофлоксацин увеличивает скорость образования мутаций и развитие резистентности к себе самому у кишечной палочки [5]. Этот антибиотик перекрестно также увеличивает частоту возникновения резистентности к карбапенему у *P. aeruginosa* [39] и к рифампину у *S. pneumoniae* [18].

Каким же образом антибиотики индуцируют мутагенез? Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют, что антибиотики не просто действуют как мутагены, повреждая тем или иным способом ДНК, а активируют SOS-ответ или ряд других программ ответа бактериальных клеток на стресс, в рамках которых увеличивается скорость возникновения мутаций.

SOS-ответ является прототипом системы контроля клеточного цикла и систем репарации эукариот. В нормальных условиях белок *LexA* связывается с операторными участками ряда генов и репрессирует их. При появлении двойных разрывов или остановке репликации ДНК образуется одноцепочечная ДНК, присоединяясь к которой, *RecA*-белок активируется и формирует *RecA*-ДНК нити (филаменты), состоящие из множества *RecA*-мономеров, молекул АТФ и ДНК. Филаменты выполняют две функции: во-первых, они индуцируют SOS-программу в ответ на повреждения ДНК, стимулируя аутопротеолиз *LexA* репрессора и посредством этого активируя транскрипцию ряда генов [24]; во-вторых, они непосредственно участвуют в гомологичной рекомбинации и репарации ДНК [21].

Фторхинолоны, в том числе ципрофлоксацин, действуют на топоизомеразы II типа — топоизомеразу IV и гиразу, — стабилизируя временные двойные разрывы, образуемые ферментами. Комплексы “ДНК-топоизомеразы” нарушают процессы репликации и транскрипции, а также могут превращаться в истинные двойные разрывы при диссоциации топоизомеразы. В свою очередь, образование двойных разрывов и остановка продвижения репликационной вилки активируют SOS-ответ.

Ципрофлоксацин на 4 порядка увеличивает скорость мутаций кишечной палочки, формирующей устойчивость к себе самому [5]. Спектр мутаций обуславливающего резистентность гена гиразы *gyrA*, возникавших до столкновения с антибиотиком, отличается от спектра мутаций, индуцируемых на селективной среде. Так, в предсуществующих вариантах в основном обнаруживаются точечные мутации. В то же время, возникшие на селективной среде мутации представляют собой как точечные мутации, так и делеции трех нуклеотидов, в результате которой сохраняется рамка считывания.

Увеличение скорости мутагенеза ципрофлоксацином зависит от активности *LexA*-белка. Му-

тагенез резко снижается у штамма кишечной палочки, у которого белок *LexA* потерял способность к аутопротеолизу и соответственно возможность активировать SOS-ответ [4]. На среде, содержащей 40 нг/мл ципрофлоксацина, 99 % бактерий погибают через 24 ч культивирования, однако оставшиеся в живых клетки персистируют еще в течение нескольких недель. Скорость мутации, возникающей до культивирования на среде с антибиотиком не изменяется у штамма, содержащего дефектный ген *lexA*<sup>-</sup>. Однако скорость индуцированных мутаций, появляющихся среди персистирующих клеток, у штаммов с этим геном снижается в 100 раз по сравнению с контролем. При концентрации антибиотика 40 нг/мл достаточно одной мутации гена *gyrA*, кодирующего гиразу, чтобы появились устойчивые варианты.

Снижение скорости мутагенеза происходит не за счет замедления роста клеток в *lexA*-мутантных штаммах, обладающих дополнительной мутацией гена *gyrA*. По отношению к контрольному штамму двойные мутанты обладают практически одинаковым ростом в отсутствие ципрофлоксацина и персистенцией в его присутствии. Наиболее вероятным объяснением снижения мутагенеза является предположение, согласно которому для индуцирования ципрофлоксацином появления устойчивых вариантов необходим белок *LexA*.

Для развития клинической резистентности к ципрофлоксацину должны накопиться несколько мутаций. Чтобы выяснить роль аутопротеолиза *LexA* в процессе накопления дополнительных мутаций, изучали *in vitro* возникновение резистентности к большим дозам антибиотика тех клеток, которые уже содержали мутацию гена *gyrA*. Если предположить, что первая и вторая мутации независимы, то у *lexA*<sup>-</sup>-мутантов резистентность к большим дозам ципрофлоксацина *in vitro* развивается со скоростью, которая приблизительно на 4 порядка ниже, чем у контрольных штаммов. Поскольку для возникновения клинической резистентности необходимо от трех до пяти мутаций, то можно предположить, что без активации SOS-ответа скорость развития клинической резистентности замедляется, по меньшей мере, на шесть порядков.

Активация SOS-ответа нужна для развития резистентности не только *in vitro*, но и *in vivo*. Патогенный штамм кишечной палочки, содержащий мутацию гена *lexA*, теряет способность приобретать устойчивость к ципрофлоксацину или рифампину у мышей с инфекцией бедренной кости [5]. При инфицировании мышей диким штаммом значительная резистентность к ципрофлоксацину развивается уже через 72 ч. При зара-

жени же мутантным штаммом резистентные колониеобразующие единицы вообще не были выявлены.

Однако белок *LexA* непосредственно не участвует в образовании мутаций. Его аутопротеолиз активирует гены SOS-ответа, среди которых гены транслейзионных ДНК полимераз: *Pol II*, *Pol IV* и *Pol V* [5]. Делеция каждой из индуцируемых SOS-ответом полимераз обладает таким же эффектом, как и предотвращение аутопротеолиза *LexA*-белка.

Транслейзионные полимеразы синтезируют ДНК при остановке репликации или при образовании повреждений ДНК, которые не может преодолеть обычная ДНК-полимераза. Такой синтез называется транслейзионным синтезом ДНК. К полимеразам, способным осуществлять транслейзионный синтез ДНК, относятся и полимеразы  $\gamma$ -семейства кишечной палочки *Pol IV* и *Pol V*. Ведущая точный репликационный синтез ДНК-полимеразы замещается одной из лишенных функции редактирования полимераз  $\gamma$ -семейства, что позволяет преодолеть препятствие введением комплементарного или, что очень важно подчеркнуть, некомплементарного нуклеотида. Транслейзионные полимеразы могут вводить одно или несколько оснований в синтезирующуюся цепь ДНК, после чего синтез продолжается посредством вновь присоединившейся обычной полимеразы. Транслейзионный синтез является ошибочным или безошибочным в зависимости от того, вводится против поврежденного нуклеотида правильный или неправильный нуклеотид. Но иногда транслейзионные полимеразы синтезируют ДНК даже на неповрежденной матрице с образованием мутаций. Такое происходит, в частности, при гипермутационезе иммуноглобулиновых генов [44].

Ципрофлоксацин увеличивает экспрессию транслейзионных ДНК-полимераз не только у *E. coli* [35], но и у *B. subtilis* [2], *P. aeruginosa* [7] и *S. aureus* [6]. Таким образом, действуя как стрессовый фактор, ципрофлоксацин активирует SOS-ответ, что индуцирует транскрипцию транслейзионных полимераз, способных вести синтез ДНК на неповрежденной матрице с образованием мутаций. Соответственно увеличивается скорость мутагенеза и вероятность образования устойчивых вариантов. Однако увеличение скорости мутагенеза носит временный характер. При удалении фактора, вызывающего стресс, программа ответа на стресс подавляется, и скорость мутагенеза существенно снижается.

Ципрофлоксацин у кишечной палочки стимулирует не только мутагенез, но и гомологичную рекомбинацию, не активируя при этом SOS-ответ [26]. В результате повышения гомологичной ре-

комбинации бактерии выживают и приобретают устойчивость к ципрофлоксацину. Хотя для рекомбинации нет необходимости в индукции SOS-ответа, однако она зависит от *RecA*-белка.

Возможно, несовпадение результатов, полученных двумя группами ученых, вызвано использованием различных штаммов *E. coli*. Несмотря на противоречивость результатов, полученные экспериментальные данные, во-первых, свидетельствуют о том, что существуют различные пути активации ципрофлоксацином механизмов создания генетических вариаций, а во-вторых, имеют практическое значение, поскольку нацеливают на поиск ингибиторов не *LexA*-белка, а *RecA*-рекомбиназы для предотвращения развития устойчивости бактерий.

Не только транслейзионные полимеразы, но и обычные репликативные полимеразы, синтезирующие ДНК в процессе репликации, индуцируют мутагенез и возникновение устойчивых вариантов. У *M. tuberculosis* SOS-ответ активирует две репликативные полимеразы — *DnaE1* и *DnaE2*. При инфицировании туберкулезной палочкой легких мышей и развитии туберкулеза возникновение устойчивости к рифампицину обусловлено именно полимеразой *DnaE2* [4]. Полимераза *DnaE2* повышает мутагенез благодаря своей способности к неточному синтезу ДНК во время репарации. Предполагается, что рифампицин индуцирует активацию *LexA*, что, в свою очередь, интенсифицирует транскрипцию *DnaE2*-полимеразы и синтез ДНК с ошибками [4].

Делеция гена *dnaE2* снижает выживаемость микобактерий при облучении ультрафиолетом и скорость приобретения резистентности к рифампицину. Смертность мышей линии *D2B6F1* (особенно чувствительной к *M. tuberculosis*) через 4 мес при инфицировании *dnaE2*-мутантным штаммом не отмечена, в то время как смертность при инфицировании штаммом дикого типа составила 20%. Полученные данные имеют не только теоретический, но и практический интерес, поскольку позволяют предположить, что подавление экспрессии или активности *DnaE2*-полимеразы способно существенно повысить эффективность лечения туберкулеза антибиотиками.

На примере рифампицина видно, что SOS-ответ активируют не только антибиотики, непосредственно повреждающие ДНК. Рифампицин ингибирует синтез РНК, в результате чего образуется комплекс “ДНК-белок”, блокирующий репликацию ДНК. Блокада репликации соответственно индуцирует SOS-ответ. Индуктором SOS-ответа являются также бета-лактамы антибиотиков, вызывающие метаболический стресс, однако они не повреждают ДНК и не останавливают ее репликацию [31, 33].

Каким же образом бета-лактамы индуцируют SOS-ответ? Двухкомпонентные сигнальные системы бактерий регулируют экспрессию генов факторами внешней среды. Стимулы, влияющие на поверхностные рецепторы, вызывают аутофосфорилирование сенсорных киназ, которые фосфорилируют белки-эффекторы (так называемые респонсивные регуляторы), что позволяет последним присоединиться к операторной или промоторной последовательности ДНК и регулировать транскрипцию.

Респонсивный регулятор *DpiA* двухкомпонентной системы *DpiBA* регулирует не только транскрипцию, но и репликацию ДНК, присоединяясь к ориджинам репликации хромосомы *E. coli* [30]. Взаимодействие снижает репликацию ДНК, и в итоге активируется SOS-ответ [30].

Такие бета-лактамы, как пенициллин, цефуроксан, цефалексин, пиперициллин увеличивают транскрипцию *dpiBA* оперона и экспрессию белка *DpiA* [31]. В результате сверхэкспрессии *DpiA* активируется SOS-ответ и соответственно увеличивается скорость мутагенеза.

Гибель кишечной палочки при действии норфлоксацина, ампициллина и канамицина происходит благодаря индукции окислительного стресса. Антибиотики индуцируют формирование гидроксильных радикалов, для чего используется внутриклеточное железо [18]. Но гидроксильные радикалы повреждают ДНК, что, по всей вероятности, активирует SOS-ответ. Помимо этого окислительный стресс может активировать *RpoS*-регулон.

Транскрипционный активатор *RpoS* (альтернативный сигма-фактор РНК-полимеразы) увеличивает экспрессию сотен генов *E. coli* [40]. Индукторами *RpoS*-регулона являются кислая среда, высокая температура, осмотический, окислительный стресс, отсутствие питательных веществ, а также фторхинолоны, аминогликозиды и бета-лактамы [16]. Ранее было показано, что *RpoS* индуцирует транскрипцию гена полимеразы *Pol IV* [25], которая, как уже рассматривалось выше, является транслейзионной полимеразой, осуществляющей неточный синтез ДНК. Но ампицилин не увеличивает экспрессию *Pol IV*. В то же время, индукция регулона нужна для зависимого от *Pol IV* мутагенеза. У *E. coli*, *V. cholerae* и *P. aeruginosa* такой результат достигается посредством подавления *RpoS*-фактором экспрессии генов, кодирующих ферменты системы репарации неправильно спаренных оснований (*Mismatch Repair System* — *MMR*). Понижение активности *MMR*-репарации кишечной палочки зависит от контролируемой *RpoS* молекулы РНК, называемой *SdsR*, которая, по-видимому, непосредственно связывается с мРНК, кодируемой геном *mutS*, и подавляет ее экспрессию.

*Campylobacter* и *Helicobacter* не обладают гомологом *LexA*, а также рядом генов репарации ДНК, рекомбинации и мутагенеза, в том числе контролируемые SOS-ответом ДНК полимеразы *Y*-семейства. Однако одним из генов *Campylobacter*, транскрипция которого в условиях обработки фторхинолонами увеличивается, является ген *mfd*, кодирующий фактор, сопрягающий репарацию с транскрипцией [17]. Экспрессия *Mfd* *B. subtilis* увеличивает скорость мутагенеза и делает его зависимым от транскрипции [37]. Механизм такого действия *mfd* не выявлен, хотя и существуют некоторые предположения по этому поводу [1, 37].

У *Campylobacter*, содержащих мутацию *mfd*-гена, скорость возникновения спонтанной и не индуцированной ципрофлоксацином устойчивости к антибиотику на два порядка ниже, чем у штаммов дикого типа. Однако при увеличении экспрессии *Mfd*-фактора в 3,8 раза скорость появления спонтанных мутаций повышается в 10 раз.

*Mfd* увеличивает вероятность возникновения резистентных вариантов, возникающих не только спонтанно, но и мутаций, индуцируемых фторхинолонами *in vitro* и *in vivo*. У кур, инфицированных *Campylobacter*, при введении энрофлоксацина весьма быстро формируется резистентность. Инактивация *mfd*-гена значительно замедляет этот процесс. Поскольку у *mfd*-мутантов скорость роста *in vitro* не уменьшалась и они колонизировали кур так же эффективно, как и бактерии дикого штамма, различие в скорости появления мутантов нельзя объяснить изменением пролиферативных возможностей бактерий. По-видимому, зависимость мутагенеза от *Mfd*-фактора не ограничивается *Campylobacter*, а является распространенным в природе феноменом. Дефектные по *mfd*-гену *Helicobacter pylori* обладают повышенной чувствительностью к антибиотикам. По всей видимости, *Mfd*-фактор ускоряет процесс формирования резистентности и у этого вида бактерий [23].

Зависимость скорости образования мутаций от *Mfd*-фактора элонгации транскрипции и сопряженной с транскрипцией репарации ДНК свидетельствует о том, что мутагенез локализован активацией специализированных механизмов при столкновении с антибиотиками не только во времени но и в пространстве генома. Связь мутагенеза с транскрипцией создает временные горячие точки образования мутаций. Локализация мутагенеза в пространстве и во времени значительно снижает его опасность и увеличивает эффективность.

Все сказанное весьма остро ставит проблему дальнейшей борьбы с развитием антибиотикоустойчивости. Если исходить из предположения о том, что она возникает случайно и не существуют

механизмы, активирующие мутагенез, то нет способов предупреждения ее развития. Это неминуемо приведет к исчерпанию возможностей антибиотикотерапии. Однако если исходить из предположения о том, что существуют механизмы создания генетической варибельности, активируемые антибиотиками и способствующие возникновению антибиотикоустойчивости, то поиск новых ингибиторов, подавляющих способность бактерий изменяться, может существенно повысить эффективность антибиотикотерапии.

Как представляется на основании анализа изложенных данных, *RecA*-рекомбиназа является одним из наиболее перспективных объектов для поиска нового класса ингибиторов. *RecA* очень консервативный белок, следовательно, он может играть сходную роль у самых разных бактерий, хотя у многих из них функции белка пока не охарактеризованы. Изучение структурных различий между активными и неактивными конформерами *RecA*-белка явилось основой для создания ингибиторов [32]. При выполнении своей биологической функции *RecA* должен присоединиться к ДНК в активной конформации. В отсутствие ДНК *RecA*-рекомбиназа принимает неактивную конформацию. АДФ и другие нуклеотиды стабилизируют неактивный конформер и ингибируют сборку *RecA*-ДНК филаментов [22, 41].

В присутствии ДНК и АДФ *RecA* принимает одно из двух активных конформационных состояний. В такой конформации происходит самосборка белков и формирование гомополимерных филаментов, которые покрывают ДНК: один мономер *RecA* на три нуклеотида ДНК. Для формирования *A*-активного состояния *RecA*-ДНК филаментов требуется связывание с АДФ, но не гидролиз АДФ. В *A*-активном состоянии *RecA*-ДНК филаменты активируют SOS-ответ с помощью *LexA*. В *P*-состоянии *RecA*-ДНК филаменты, состоящие из *RecA*, АДФ и трех цепей ДНК, используют гидролиз АДФ для осуществления гомологичной рекомбинации и рекомбинационной репарации.

Группой *Singleton* был проведен скрининг 35 780 веществ с маленькой молекулярной массой с помощью колориметрической оценки АДФазной активности *RecA*, что позволило выявить 6 классов соединений, являющихся ингибиторами АДФазной активности *RecA*-белка *in vitro*. Эти соединения работают в диапазоне 10-30 мкмоль/л [42].

Дальнейший скрининг 33 600 веществ, отобранных из библиотеки, содержащей 350 000 соединений, позволил выявить 40 ингибиторов АДФазной активности *RecA*-белка, относящихся к 4 классам. Наиболее активным ингибитором является 2-амино-4,6-диарилпиримидин [38]. Более того, в на-

стоящее время найдены новые ингибиторы *RecA*-рекомбиназы и показано, что они подавляют активность белка не только *in vitro*, но и *in vivo* [34].

Помимо мутаций устойчивость к антибиотикам может приобретаться за счет мобильных элементов, интегროнов и горизонтального переноса генов. Интегроном называется класс элементов, в которые с помощью сайт-специфической рекомбинации внедряются и из которых удаляются мобильные генные кассеты. Интегроны не содержат аппарат для перемещений, но они часто расположены на мобильных элементах — плаزمиде или транспозоне. Интегроны содержат ген интегразы, сайт для рекомбинации и промотор, который обеспечивает транскрипцию не обладающих промоторами генов, внедренных в интегрон и называемых генными кассетами. Генные кассеты состоят из кодирующей и повторяющейся последовательностей, которые являются сайтом рекомбинации, однако обычно не содержат полный промотор.

В интегронах только что приобретенная кассета интенсивно экспрессируется с промотора, но по мере приобретения новых кассет или в результате рекомбинации старая кассета удаляется от промотора и ее экспрессия снижается [29]. Однако в условиях активации SOS-ответа у генов, расположенных в удаленных районах интегროнов, появляется шанс поменять свою позицию, приблизиться к промотору и изменить уровень экспрессии [15]. Индукция SOS-ответа вызывает увеличение скорости эксцизии кассет мобильных интегროнов на два порядка. Это происходит потому, что SOS-ответ увеличивает транскрипцию гена интегразы и посредством этого — скорость рекомбинации генных кассет. За счет активации интегразы и рекомбинации гены ответа к антибиотикам могут поменять свое положение внутри интегрона, переместившись ближе к промотору, что, соответственно, усилит их экспрессию. Роль индукции SOS-ответа антибиотиком в формировании устойчивых вариантов с помощью перемещения генной кассеты внутри интегрона подтверждена *in vivo* [19].

Хорошо известно, что горизонтальный перенос генов повышает вероятность приобретения бактериями устойчивости к антибиотикам. Ранее считалось, что горизонтальные перемещения конъюгативных транспозонов является спонтанным процессом. Однако оказалось, что это не всегда верно. Конъюгативный транспозон *SXT* кодирует *SetR*-белок, подавляющий экспрессию активаторов переноса *SXT*-генов — *setC* и *setD*. При индукции SOS-ответа антибиотиками ингибитор *SetR* расщепляется и инактивируется [3]. В результате инактивации *SetR* гены *setC* и *setD* начинают транскрибироваться, а скорость горизонтального переноса повышается.

Более того, *SXT*-элементы с большой частотой индуцируют горизонтальный перенос обычно немобильных трех геномных островов *V. cholerae* [8]. Эكцизия геномных островов контролируется генами *setC* и *setD*. Но, как отмечалось выше, экспрессия этих генов активируется *SOS*-ответом [3]. Поэтому не удивительно, что частота переноса геномных островов увеличивается более чем в 100 раз при активации *SOS*-ответа. В свою очередь, мобилизуемые *SXT*-острова при горизонтальном переносе могут захватывать ДНК размером до 1 млн.п.н. Следовательно, *SXT*-элементы способны мобилизовать практически всю хромосомную ДНК при столкновении с антибиотиками. По сути это механизм создания новых комбинаций генов в стрессовых условиях из генетического материала, которым обладает популяция.

Индукция антибиотиками *SOS*-ответа активирует горизонтальный перенос генов, осуществляемый бактериофагами, а также процесс трансформации, что подробно рассмотрено и в нашей работе [1]. По всей вероятности, применение ингибиторов *RecA* позволит затормозить разнообразные механизмы горизонтального переноса генов и повлиять на скорость развития антибиотикорезистентности.

Для практики очень важно осознать тот факт, что наличие механизмов горизонтального переноса генов означает существование ферментов, которые являются мишенями для ингибиторов. Например, соединения, содержащие бифосфонаты (хлордронат и этидронат), ингибируют *TraI*-релаксазу *F*-плазмиды *in vitro* кишечной палочки и конъюгативный перенос этой плазмиды *in vivo* [27]. Но релаксазы являются основными компонентами систем конъюгативного переноса. В свою очередь, совпадение последователь-

ности релаксазы *TraI F*-плазмиды с релаксазами многих плазмид, которые способны переносить гены антибиотикорезистентности, достигает 99 %. Поэтому представляется очень перспективным применение подобных ингибиторов в сочетании с антибиотиками для предотвращения захвата *in vivo* патогенами факторов резистентности при антибиотикотерапии.

У *S. pneumoniae* устойчивые варианты могут возникать за счет активации антибиотиками процесса трансформации феромоном *CSP*. Использование синтетических аналогов *CSP* подавляет развитие компетентности и приобретение устойчивости к стрептомицину [46]. Так, два аналога *CSP*-феромона — *CSP1-E1A* и *CSP2-E1A* — полностью подавляют способность *S. pneumoniae* приобретать ген устойчивости к стрептомицину и ген, необходимый для образования капсулы, препятствуя этим развитию антибиотикоустойчивости и вирулентности бактерий.

Подводя итог, следует подчеркнуть следующее. Наличие механизмов изменчивости означает существование регуляторных факторов и ферментов, активно перестраивающих геном и способствующих образованию мутаций [1]. Учитывая ту остроту, с которой сейчас предстала проблема формирования устойчивости к химиопрепаратам, изучение механизмов генетической изменчивости, а также способов их регуляции и поиск средств подавления их активности при антибиотикотерапии являются насущной необходимостью. Этот подход может значительно улучшить результаты химиотерапии, затормозив сам процесс развития устойчивости к антибиотикам. По сути, такие же корни и проблемы формирования устойчивости к антисептикам, дезинфектантам и противоопухолевым цитостатикам.

### Список использованной литературы

1. Волянский Ю. Л., Колотова Т. Ю., Кучма И. Ю. и др. Механизмы изменчивости генома прокариот. — Харьков: НТМТ, 2012. — 320 с.
2. Au N., Kuester-Schoeck E., Mandava V. et al. Genetic composition of the *Bacillus subtilis* *SOS* system // *J. Bacteriol.* — 2005. — **187**. — P. 7655-7666.
3. Beaber J. W., Hochhut B., Waldor M. K. *SOS* response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes // *Nature*. — 2004. — **427**. — P. 72-74.
4. Boshoff H. I., Reed M. B., Mizrahi V. DnaE2 polymerase contributes to *in vivo* survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Cell*. — 2003. — **113**. — P. 183-193.
5. Cirz R. T., Chin J. K., Andes D. R. et al. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance // *PLoS Biol.* — 2005. — **3**. — P. e176.
6. Cirz R. T., Jones M. B., Gingles N. A. et al. The complete and *SOS*-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin // *J. Bacteriol.* — 2007. — **189**. — P. 531-539.
7. Cirz R. T., O'Neill B. M., Hammond J. A. et al. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* *SOS* response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin // *J. Bacteriol.* — 2006. — **188**. — P. 7101-7110.
8. Daccord A., Ceccarelli D., Burrus V. Integrating conjugative elements of the *SXT/R391* family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands // *Mol. Microbiol.* — 2010. — **78**. — P. 576-588.
9. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes // *Science*. — 1994. — **264**. — P. 375-382.
10. Drlica K., Zhao X. DNA Gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1997. — **61**. — P. 377-392.
11. Fung-Tomc J., Kolek B., Bonner D. P. Ciprofloxacin-induced, low-level resistance to structurally unrelated

- antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1993. — **37**. — P. 1289-1296.
12. Galhardo R. S., Hastings P. J., Rosenberg S. M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2007. — **42**. — P. 399-435.
  13. Gillespie, S. H., Basu S., Dickens A. L. et al. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2005. — **56**. — P. 344-348.
  14. Gocke E. Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria // *Mutat. Res.* — 1991. — **248**. — P. 135-143.
  15. Guerin E., Cambray G., Sanchez-Alberola N. et al. The SOS response controls integron recombination // *Science.* — 2009. — **32**. — P. 1034.
  16. Gutierrez A., Laureti L., Crussard S. et al.  $\beta$ -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity // *Nat. Commun.* — 2013. — **4**. — P. 1610.
  17. Han J., Sahin O., Barton Y.-W., Zhang Q. Key role of Mfd in the development of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* // *PLoS Pathog.* — 2008. — **4**. — P. e1000083.
  18. Henderson-Begg S. K., Livermore D. M., Hall L. M. C. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae* // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2006. — **57**. — P. 849-854.
  19. Hocquet D., Llanes C., Thouverez M. et al. Evidence for Induction of Integron-Based Antibiotic Resistance by the SOS Response in a Clinical Setting // *PLoS Pathog.* — 2012. — **8**. — P. e1002778.
  20. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell.* — 2007. — **130**. — P. 797-810.
  21. Kowalczykowski S. C., Eggleston A. K. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins // *Annu. Rev. Biochem.* — 1994. — **63**. — P. 991-1043.
  22. Lee A. M., Ross C. T., Zeng B. B., Singleton S. F. A molecular target for suppression of the evolution of antibiotic resistance: Inhibition of the *Escherichia coli* RecA protein by N(6)-(1-Naphthyl)-ADP // *J. Med. Chem.* — 2005. — **48**. — P. 408-411.
  23. Lee G. H., Jeong J. Y., Chung J. W. et al. The *Helicobacter pylori* Mfd protein is important for antibiotic resistance and DNA repair // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 2009. — **65**. — P. 454-460.
  24. Little J. W., Edmiston S. H., Pacelli L. Z., Mount D. W. Cleavage of the *Escherichia coli* *lexA* protein by the *recA* protease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1980. — **77**. — P. 3225-3234.
  25. Lombardo M.-J., Aponyi I., Rosenberg S. M. General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli* // *Genetics.* — 2004. — **166**. — P. 669-680.
  26. Lopez de Saro F. J., Georgescu R. E., Goodman M. F., O'Donnell M. Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair // *EMBO J.* — 2003. — **23**. — P. 6408-6418.
  27. Lujan S. A., Guogas L. M., Ragonese H. et al. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2007. — **104**. — P. 12282-12287.
  28. Luria S. E., Delbruck M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // *Genetics.* — 1943. — **28**. — P. 491-511.
  29. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2006. — **4**. — P. 608-620.
  30. Miller C., Ingmer H., Thomsen L. E. et al. DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response // *J. Bacteriol.* — 2003. — **185**. — P. 6025-6056.
  31. Miller C., Thomsen L. E., Gaggero C. et al. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality // *Science.* — 2004. — **305**. — P. 1629-1660.
  32. Nishinaka T., Ito Y., Yokoyama S., Shibata T. An extended DNA structure through deoxyribose-basestacking induced by RecA protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — **94**. — P. 6623-6628.
  33. Perez-Capilla T., Baquero M.-R., Gomez-Gomez J.-M. et al. SOS-Independent induction of *dinB* transcription by beta-lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* — 2005. — **187**. — P. 1515-1518.
  34. Peterson E. J., Janzen W. P., Kireev D., Singleton S. F. High-throughput screening for RecA inhibitors using a transcreener adenosine 5'-O-diphosphate assay // *Assay Drug. Dev. Technol.* — 2012. — **10**. — P. 260-268.
  35. Power E. G., Phillips I. Correlation between *umuC* induction and *Salmonella* mutagenicity assay for quinolone antimicrobial agents // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1993. — **112**. — P. 251-254.
  36. Rando O. J., Verstrepen K. J. Timescales of genetic and epigenetic inheritance // *Cell.* — 2007. — **128**. — P. 655-668.
  37. Ross C., Pybus C., Pedraza-Reyes M. et al. Novel role of *mfd*: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* — 2006. — **188**. — P. 7512-7520.
  38. Sexton J. Z., Wigle T. J., He Q. et al. Novel Inhibitors of *E. coli* RecA ATPase Activity // *Curr. Chem. Genomics.* — 2010. — **4**. — P. 34-42.
  39. Tanimoto K., Tomita H., Fujimoto S. et al. Fluoroquinolone enhances the mutation frequency for meropenem-selected carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but use of the high-potency drug doripenem inhibits mutant formation // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2008. — **52**. — P. 3795-3800.
  40. Weber H., Polen T., Heuveling J. et al. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity // *J. Bacteriol.* — 2005. — **187**. — P. 1591-1603.
  41. Wigle T. J., Lee A. M., Singleton S. F. Conformationally selective binding of nucleotide analogues to *Escherichia coli* RecA: A ligand-based analysis of the RecA ATP binding site // *Biochemistry.* — 2006. — **45**. — P. 4502-4513.
  42. Wigle T. J., Sexton J. Z., Gromova A. V. et al. Inhibitors of RecA activity discovered by high-throughput screening: cell-permeable small molecules attenuate the SOS response in *Escherichia coli* // *J. Biomol. Screen.* — 2009. — **14**. — P. 1092-1101.
  43. Ysern P., Clerch B., Castano M. et al. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones // *Mutagenesis.* — 1990. — **5**. — P. 63-66.



44. Zeng X., Winter D., Kasmer C. et al. DNA polymerase h is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes // *Nat. Immunol.* — 2001. — 2. — P. 537-541.
45. Zhang Q., Lambert G., Liao D. et al. Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments // *Science.* — 2011. — 333. — P. 1764-1767.
46. Zhu L., Lau G. W. Inhibition of competence development, horizontal gene transfer and virulence in *Streptococcus pneumoniae* by a modified competence stimulating peptide // *PLoS Pathog.* — 2011. — 7. — P. e1002241.

Получено 20.03.2013

## **SOS У ПРЯМОМУ ТА ПЕРЕНОСНОМУ ЗНАЧЕННЯХ. НОВА СТРАТЕГІЯ БОРОТЬБИ З РОЗВИТКОМ СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ (огляд літератури)**

**Ю. Л. Волянський, Т. Ю. Колотова, І. Ю. Кучма\***

Державна установа “Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України”, 61057 Харків  
\*Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, 61057 Харків

Клінічна стійкість до антибіотиків розвивається дуже швидко. Формуються стійкі варіанти за рахунок мутацій, перебудов геному і горизонтального перенесення генів. Згідно із загальноприйнятими поглядами теорії еволюції, зміни геному виникають випадково, постійно, з однаковою швидкістю і в будь-якій точці геному; тому втручання в процес формування антибіотикостійкості неможливо. Однак останнім часом такі погляди на природу генетичної мінливості піддаються перегляду. Так, показано, що існують молекулярні механізми, локалізуючі появу мутацій, перебудови і процеси горизонтального перенесення генів у часі і в просторі геному. Активуються механізми мінливості в стресових умовах, у тому числі при зустрічі з антибіотиками. Бактеріальні клітини мають такі програми відповіді на стресові фактори, як SOS-відповідь і загальна відповідь на стрес, яка залежить від *RpoS*-регулона. Активація обох програм тимчасово прискорює мутагенез, а SOS-відповідь — рекомбінацію і горизонтальний перенос генів. Утворення мутацій збільшується в тимчасово формуючихся процесом транскрипції гарячих точках. Інгібітори, що пригнічують індукцію механізмів мінливості, а також безпосередньо ферментів, що беруть участь у створенні генетичних варіантів, можуть істотно уповільнити розвиток стійкості до антибіотиків. Тому представляється актуальним пошук таких інгібіторів, які б пригнічували розвиток стійкості мікробів до антибіотиків.

## **SOS IN LITERAL AND METAPHORICAL SENSE. A NEW STRATEGY TO FIGHT DEVELOPMENT OF ANTIBIOTIC RESISTANCE (review of literature)**

**Yu. L. Volianskiy, T. Yu. Kolotova, I. Yu. Kuchma\***

State Institution “I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology NAMS Ukraine”, 61057 Kharkov  
\*Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education Ministry of Health Ukraine, 61057 Kharkov

Clinical resistance to antibiotics develops quite rapidly through formation of resistant versions due to mutations, recombination and horizontal gene transfer. Evolutionary theory assumed that genome rearrangement and mutations occur constantly, gradually and randomly over time and uniformly over space of genome; that is why no interference in the process of bacterial resistance to antibiotics is possible. This basic assumption about the nature of the genome change has been challenged by the new discoveries. The existence of molecular mechanisms that localize mutations, recombination and horizontal gene transfer in time and in space of the genome has recently been proved. The mutation mechanisms are activated at stress, particularly, when meeting antibiotics. Bacterial cell possess programs to respond stress situations, specifically, SOS response and general response to stress, which depends on sigma factor *RpoS*. Activation of both programs was shown to temporarily accelerate mutagenesis, whereas SOS-response — recombination and horizontal gene transfer. Formation of mutations is increased over in the hot spots, which are temporarily formed by transcription process. Inhibitors, which suppress induction of variability mechanisms, as well as directly enzymes, which participate in the development of genetic variants, are capable of significantly slowing down development of resistance to antibiotics. Therefore quite prospective can be a search for the inhibitors, capable of suppressing development of bacterial resistance to antibiotics.