

УДК 577.151.4; 579.253.4

Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам

А. М. Егоров, М. М. Уляшова, М. Ю. Рубцова*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2018

Принята к печати 29.08.2018

РЕФЕРАТ Резистентность к антибиотикам развивается уже более 2 млрд лет и широко распространена среди микроорганизмов. Ключевую роль в формировании резистентности играют бактериальные ферменты, классификация которых основана на участии в различных каталитических процессах: модификации ферментов, являющихся мишенями антибиотиков, и внутриклеточных мишеней, трансформации молекул антибиотиков и осуществлении реакций клеточного метаболизма. Основные механизмы развития резистентности связаны с эволюцией суперсемейств бактериальных ферментов, обусловленной изменчивостью кодирующих их генов, совокупность которых получила название «резистом». Десятки тысяч ферментов и их мутантов, реализующих различные механизмы резистентности, образуют новое сообщество, названное «энзистом». Анализ структуры и функциональных особенностей ферментов – мишеней разных классов антибиотиков, позволит выработать новые стратегии преодоления резистентности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибиотики, антибиотикорезистентность, классы ферментов, мутантные формы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АБП – антибактериальные препараты; АГМФ – аминогликозидмодифицирующие ферменты; БЛРС – β -лактамазы расширенного спектра; МБЛ – металло- β -лактамазы; МКЛС – макролиды, кетолиды, линкозамиды и стрептограмин; ПСБ – пенициллинсвязывающие белки; ААС – аминогликозид-N-ацетилтрансферазы; АНТ – аминогликозид-O-аденилилтрансферазы; АРН – аминогликозид-O-фосфотрансферазы; САТ – хлорамфеникол-ацетилтрансфераза; МРН – макролидные фосфотрансферазы; NAG – N-ацетилглюкозамин; NAM – N-ацетилмурамовая кислота; QRDR – область, детерминирующая устойчивость к хинолонам; SAM – S-аденозил-L-метионин.

ВВЕДЕНИЕ

Резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам является глобальной проблемой биологии и медицины [1, 2]. Современные антибактериальные препараты (АБП) представляют самую большую группу фармацевтических препаратов, включающую 16 классов соединений как природного происхождения, так и химически синтезированных (рис. 1).

Синтез антибиотиков существует в природе более 2 млрд лет, и все это время у бактерий развиваются механизмы резистентности к их токсическому действию. Резистентность может возникать как адаптивный процесс, не связанный со структурой антибиотика, или развиваться как результат селекции устойчивых штаммов микроорганизмов под действием антибиотиков. Под действием антропогенных факторов, связанных с применением антибиотиков с середины XX века в медицине и особенно в сельском хозяйстве, механизмы резистентности значительно эволюционировали, при этом существенно сократилось время появления устойчивости к новым препаратам [3, 4].

Роль бактериальных ферментов в формировании резистентности разнообразна и включает несколько основных механизмов (рис. 2) [5]. Ферменты, участвующие в процессах биосинтеза клеточной стенки, синтезе нуклеиновых кислот и метаболитов, служат непосредственной мишенью антибиотиков. Механизмом резистентности являются структурные изменения этих ферментов. Другой механизм связан с ферментативной модификацией структурных элементов, на которые действуют антибиотики, например, модификация рибосом метилтрансферазами. Большая группа ферментов модифицирует или разрушает структуру самих антибиотиков, инактивируя их. В формировании резистентности участвуют также ферменты, катализирующие метаболические процессы, модифицирующие АБП в форме пролекарств.

Бактериальные ферменты, определяющие резистентность, входят, как правило, в состав больших суперсемейств, и многие из них произошли от ферментов, изначально имевших другие функции [6]. Гены, ответственные за синтез этих ферментов и их

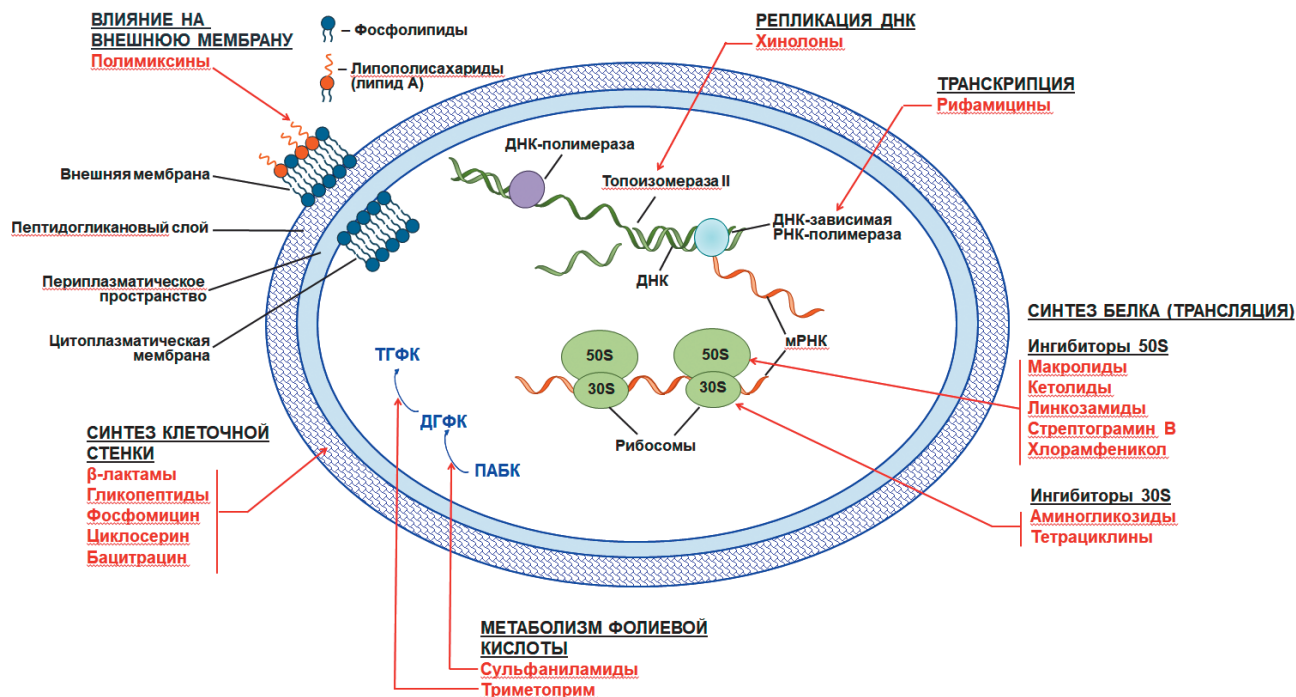


Рис. 1. Основные классы антибактериальных препаратов, их мишени и влияние на основные процессы жизнедеятельности бактериальной клетки



Рис. 2. Классы ферментов, участвующих в различных механизмах резистентности к АБП

мутационную изменчивость, часто локализованы на мобильных генетических элементах, что обеспечивает быстрое распространение резистентности между микроорганизмами.

В обзоре представлены данные о функциональных особенностях основных классов и групп бактериальных ферментов, участвующих в реализации механизмов резистентности бактерий к АБП.

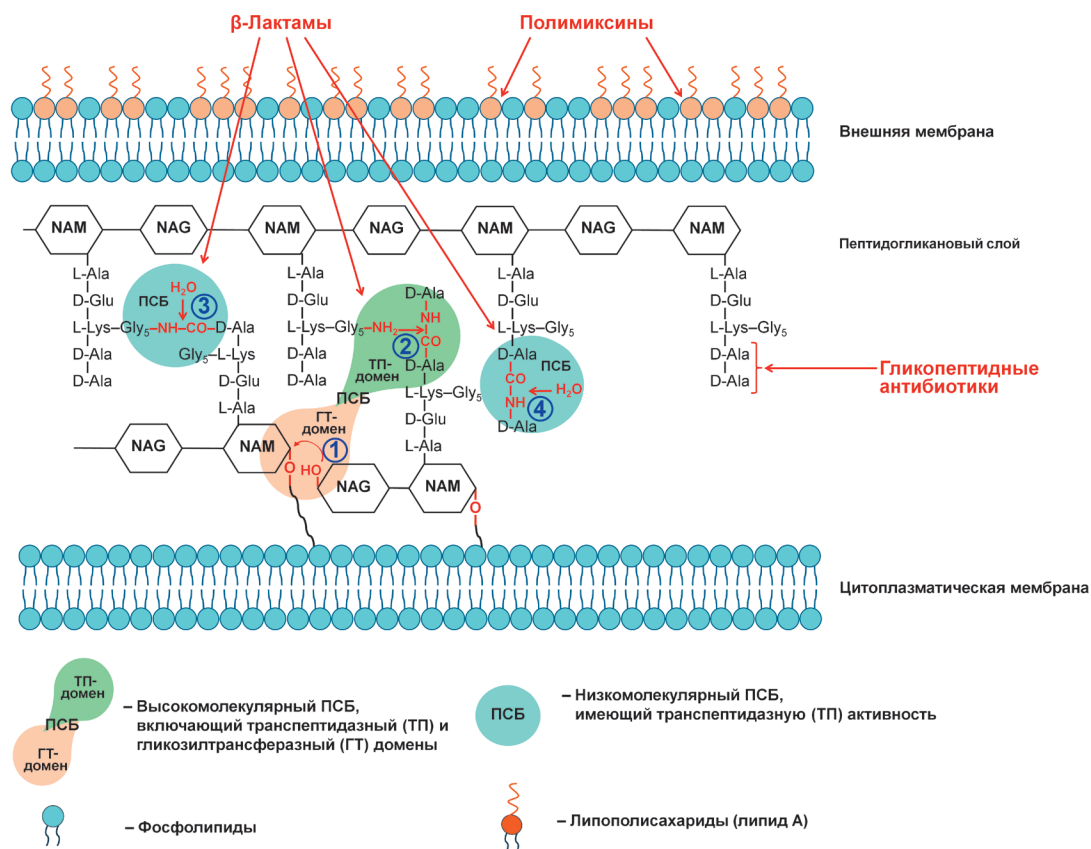


Рис. 3. Структура пептидогликана клеточной стенки бактерий и участие пенициллинсвязывающих белков в его синтезе: 1 – трансгликозилазная реакция, 2 – транспептидазная реакция, 3 – эндопептидазная реакция, 4 – карбокси-пептидазная реакция

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ – МИШЕНИ АБП

Пенициллинсвязывающие белки

Пенициллинсвязывающие белки (ПСБ) играют ключевую роль в синтезе пептидогликана – основного компонента клеточных стенок бактерий, и являются мишенью действия β -лактамных антибиотиков. Пептидогликан представляет собой полимер, состоящий из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) (рис. 3). Ко всем остаткам NAM присоединены пептиды из L-Ala, D-Glu, мезо-диаминопимелиновой кислоты или L-Lys и двух остатков D-Ala [7]. ПСБ связаны с внутренней мембраной клетки или находятся в свободном виде в цитоплазме [8, 9]. ПСБ делят на высокомолекулярные (> 50 кДа), состоящие из двух доменов, и низкомолекулярные (< 50 кДа).

N-Концевой домен высокомолекулярных ПСБ катализирует реакции трансгликозилирования (последовательное удлинение гликановых цепей присоединением NAG-NAM-пентапептида к гликановому остову, 1 на рис. 3), C-концевой домен – транспептидазные реакции (образование поперечных сшивок пептидных остатков двух гликановых цепей, 2 на рис. 3). Низкомолекулярные ПСБ предотвращают

образование поперечных сшивок в пептидогликане, они катализируют эндопептидазные (гидролиз пептидной связи, соединяющей две гликановые цепи, 3 на рис. 3) и карбоксипептидазные (гидролиз связи в дипептиде D-Ala-D-Ala, 4 на рис. 3) реакции.

C-Концевые домены всех ПСБ являются мишенью β -лактамных антибиотиков, которые составляют более половины всех используемых АБП [10]. Эти антибиотики содержат β -лактамное кольцо, являющееся структурным аналогом дипептида D-Ala-D-Ala, и поэтому действуют как конкурентные ингибиторы ПСБ. В результате взаимодействия карбонила β -лактамного кольца с гидроксильной группой серина в активном центре ПСБ образуется неактивная ацилированная форма фермента. Необратимое ингибирование нарушает синтез клеточной стенки бактерий [9, 10].

Основные причины резистентности грамположительных бактерий к β -лактамным антибиотикам – мутации нативных ПСБ, их гиперпродукция и синтез новых ПСБ, малочувствительных к ингибированию β -лактамами [11]. В настоящее время угрозой представляется распространение штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к метициллину и другим полусинтетическим пенициллинам и цефалоспорином [12]. Резистентность обусловлена экс-

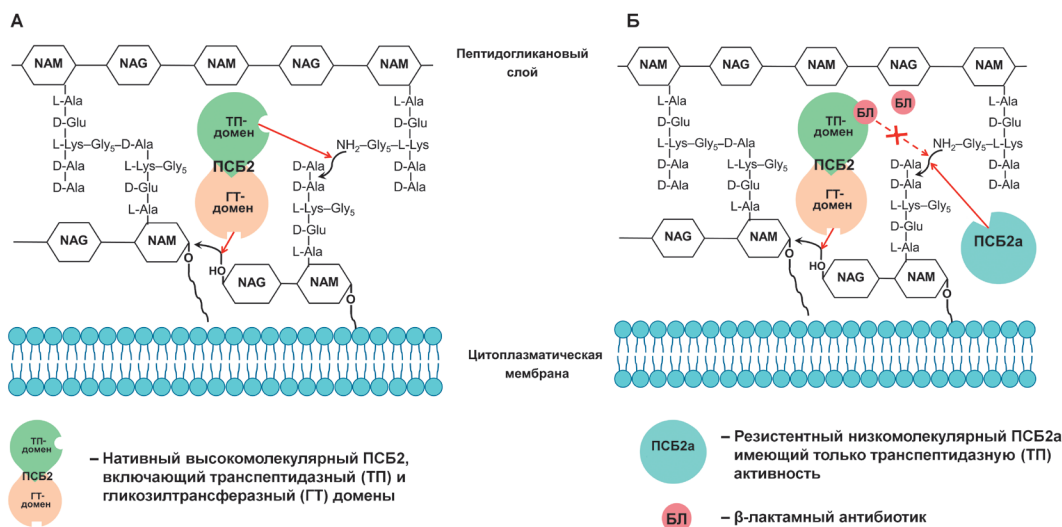


Рис. 4. Роль пенициллинсвязывающих белков в резистентности грамположительных бактерий к β -лактамным антибиотикам. А – чувствительный штамм, Б – резистентный штамм

прессией в дополнение к четырем нативным ПСБ пятого фермента ПСБ2а, который характеризуется низким сродством к β -лактамным антибиотикам и обладает только транспептидазной активностью. Механизм резистентности представлен на *рис. 4*: в отсутствие антибиотика в биосинтезе пептидогликана участвуют оба домена высокомолекулярного ПСБ (А), в присутствии антибиотика у высокомолекулярного ПСБ активным остается только гликозилтрансферазный домен, транспептидазный домен ацилируется и не образует поперечные сшивки. У резистентного штамма транспептидазную активность проявляет приобретенный низкомолекулярный ПСБ2а (Б), что восстанавливает жизнеспособность клеток.

Ферменты типа ПСБ2а кодируются генами *mecA* [13] или *mecC* [14]. Гены *mecA* и *mecC* вместе с генами, регулирующими их экспрессию (*mecI*, *mecR1* и *mecR2*), входят в состав мобильного генетического элемента «стафилококковой хромосомной кассеты *mec*» [15].

Белки, входящие в семейство ПСБ, ключевые для формирования клеточной стенки бактерий, являются также предшественниками резистентности, обусловленной продукцией β -лактамаз (раздел « β -Лактамазы»).

Топоизомеразы типа II: ДНК-гираза и топоизомераза IV

Топоизомеразы типа II включают ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, которые катализируют изменения пространственной конфигурации молекулы ДНК в процессах репликации, транскрипции и деления клеток [16, 17]. ДНК-гираза и топоизомераза IV представляют собой гетеротетрамерные ферменты: ДНК-гираза состоит из двух субъединиц GyrA (97 кДа)

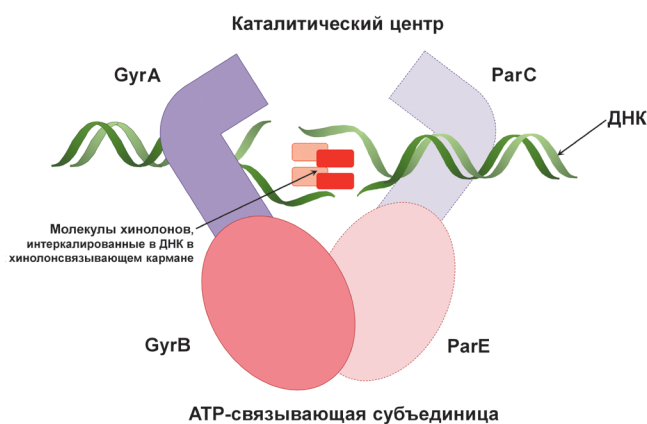


Рис. 5. Схема структуры тройного комплекса топоизомеразы типа II с ДНК и хинолонами (GyrA, GyrB – субъединицы гиразы, ParC, ParE – субъединицы топоизомеразы IV)

и двух субъединиц GyrB (90 кДа); топоизомераза IV состоит из двух субъединиц ParC (84 кДа) и двух ParE (70 кДа). Субъединицы GyrA и ParC образуют каталитические домены, участвующие в образовании комплексов с молекулой ДНК для ее разрыва/лигирования, субъединицы GyrB и ParE обладают АТФ-азной активностью для энергообеспечения процесса.

ДНК-гираза и топоизомераза IV служат мишенью хинолонов и их производных – фторхинолонов. Необходимым условием ингибирования является образование комплекса ДНК с топоизомеразой типа II (*рис. 5*). Участок связывания антибиотика с ферментом в составе тройного комплекса получил название «хинолоновый карман» [17, 18].

GyrA	A	R	K	Y	H	G	D	S	A	D	T	Q	S	Q
67	68	76	77	80	81	82	83	84	87	88	94	97	106	Q
	S	S	T	S	N	C	G	L	P	N	P	L	L	H
					D			Y		Y				S
								A		G				
								W		R				
								I		L				
								F		V				
								V						
								T						

ParC	V	D	K	Y	H	G	D	S	A	D	T	Q
67	69	74	77	78	80	84	86	87	91	93	100	
	I	E	S	P	C	I	G	V	G	S	L	A
						R	A					
						L	K					
							V					
							N					
							D					

Рис. 6. Аминокислотные мутации в области QRDR субъединиц GyrA и ParC топоизомераз типа II бактерий *E. coli*, определяющие резистентность к хинолонам. Цветом выделены положения мутаций, сочетание которых вызывает синергический эффект

Антибиотик нековалентно связывается с активным центром фермента, в результате чего продвижение фермента и, следовательно, репликационной вилки вдоль молекулы ДНК останавливается [19]. Формирование тройного комплекса хинолон–топоизомераза типа II–ДНК останавливает не только репликацию, но и транскрипцию, так как блокируется движение РНК-полимеразы по ДНК-матрице [20]. При этом в двухцепочечной молекуле ДНК формируются разрывы, что также обуславливает бактерицидное действие хинолонов [21]. Хинолоны не действуют на топоизомеразы типа II млекопитающих вследствие их существенных отличий от топоизомераз бактерий.

Развитие резистентности к хинолонам связано, в первую очередь, со снижением эффективности их взаимодействия с комплексом ДНК–топоизомераза типа II вследствие мутаций в генах, приводящих к аминокислотным заменам в области «хинолонового кармана». Участки генов, в которых происходят мутации, получили название QRDR (quinolone resistance determining region – область, детерминирующая устойчивость к хинолонам). Эти мутации локализованы у бактерий большей частью в N-концевой части субъединицы GyrA (участок между остатками 67–106 по нумерации *Escherichia coli*) и/или субъединицы ParC (аминокислотные остатки 63–102) (на рис. 6 приведены мутации у бактерий *E. coli*), но могут также затрагивать субъединицы GyrB и ParE [18]. Степень снижения чувствительности к антибиотику зависит от типа мутации и формируется постепенно: сначала мутации возникают в одном ферменте и только позже в другом. Замена одной аминокислоты в положении 67 субъединицы GyrA у *E. coli* приводит к увеличению МПК всех фторхинолонов в 4 раза, в положении 81 той же субъединицы – в 8 раз, в положении 87 – в 16 раз, в положении 83 – в 32 раза [22]. У штаммов микроорганизмов с высоким уровнем резистентности к хи-

нолонам гены обеих субъединиц содержат несколько мутаций, при этом часто наблюдается синергический эффект. Так, при сочетании мутаций в положениях 83 и 87 GyrA и в положении 80 ParC МПК фторхинолонов повышается уже более чем в 4000 раз [22].

ДНК-зависимая РНК-полимераза

Бактерицидное действие рифамицинов (рифампицин, рифабутин) состоит в ингибировании ДНК-зависимой РНК-полимеразы [23]. Этот фермент состоит из пяти субъединиц: двух α (молекулярная масса каждой 35 кДа), β – (155 кДа), β' – (165 кДа) и σ – (70 кДа). Четыре субъединицы $\beta\beta'\alpha\alpha$ образуют так называемый апофермент, обладающий каталитической активностью и осуществляющий все основные этапы транскрипции. Для начала транскрипции и распознавания промоторов бактериальных генов требуется образование холофермента, происходящее при присоединении регуляторной σ -субъединицы к апоферменту [24].

Рифамицины селективно связываются с β -субъединицей фермента вблизи главного канала и блокируют элонгацию зарождающейся цепи РНК. Возникновение резистентности к рифамицинам в большинстве случаев связано с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте гена *rpoB* (кодоны 507–533), кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы. Наибольшим полиморфизмом характеризуются мутации аминокислотных остатков в положениях 513, 516, 526 и 531 (рис. 7) [25].

Ферменты биосинтеза миколовых кислот

Миколовые кислоты – обобщенное название группы длинноцепочечных разветвленных жирных кислот, компонентов клеточной стенки микобактерий. Синтез миколовых кислот подавляют некоторые противотуберкулезные препараты – производные изоникотиновой кислоты (изониазид, этионамид и протиона-

RpoB	507 G	508 T	510 Q	511 L	512 S	513 Q	514 F	515 M	516 D	517 Q	518 N	519 N	521 L	522 S	525 T	526 H	527 L	528 R	529 R	531 S	533 L
	D	A	H	R	T	K	L	V	V	E	H	K	M	L	N	Y	N	P	K	L	P
		S		V	R	P			Y		S			E		D	H	E		W	
			P			L			G							R				F	
						E			E							L				Y	
									K							C				C	
									A							P				Q	
									N							N					
									N							T					
									N							Q					
									N							V					
									N							E					
									N							G					

Рис. 7. Аминокислотные мутации фрагмента RpoB β-субъединицы РНК-полимеразы, определяющие резистентность к рифамицинам

мид) [25, 26]. Действие этих препаратов направлено на редуктазу белка-переносчика еноил-ацильного радикала *InhA*, которая входит в состав синтазы жирных кислот FAS-II. Она катализирует восстановление D₂-ненасыщенных жирных кислот в насыщенные с использованием кофактора NADPH в качестве донора водорода [27]. При нарушении синтеза миколовых кислот подавляется синтез клеточной стенки микобактерий.

Устойчивость к этим препаратам обусловлена мутациями в гене *inhA*, которые затрагивают промоторный участок оперона *mabA-inhA*, вызывая гиперпродукцию фермента, или последовательность, кодирующую фермент, что обуславливает снижение его аффинности к комплексу радикала изоникотиновой кислоты и NAD⁺ [28, 29].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ МИШЕНИ АБП

рРНК-метилтрансферазы

Мишенью многих АБП являются бактериальные рибосомы [30]. Малая субъединица 30S состоит из 16S рРНК и 21 белка. Аминогликозиды связываются с 30S субъединицей с образованием водородных связей с азотистыми основаниями нескольких нуклеотидов 16S рРНК, что препятствует правильному связыванию аминоацил-тРНК с антикодоном и приводит к ошибкам в синтезе белка и последующей гибели клетки (рис. 8А). Некоторые аминогликозиды могут напрямую ингибировать инициацию или блокировать элонгацию полипептидной цепи [30, 31].

Один из механизмов резистентности к аминогликозидам – метилирование А-сайта 16S рРНК бактериальными 16S рРНК-метилтрансферазами, в результате чего антибиотики теряют способность связываться с рибосомой [32, 33]. Донором метильной группы для этих ферментов служит S-аденозил-L-метионин (SAM). Описано 11 различных 16S рРНК-

метилтрансфераз, которых делят на две группы по типу модифицируемого нуклеотида в А-сайте. Первая группа ферментов (*ArmA*, *RmtA*, *RmtB*, *RmtC*, *RmtD1*, *RmtD2*, *RmtE*, *RmtF*, *RmtG* и *RmtH*) катализирует метилирование 16S рРНК по положению N-7 в нуклеотиде G1405 и обеспечивает резистентность бактерий только к 4,6-дизамещенным аминогликозидам. Ко второй группе относится метилтрансфераза *NmpA*, которая метилирует нуклеотид A1408 по положению N-1 и обеспечивает резистентность ко всем известным аминогликозидам, кроме стрептомицина и спектиномицина [31, 32].

Гены, кодирующие данные ферменты, локализованы в основном на конъюгативных плаزمидах и/или связаны с транспозонами, причем часто они сцеплены с другими генами антибиотикорезистентности [34]. Наиболее распространены ферменты *RmtB* и *ArmA*. Продукты *RmtB* выделены не только из клинических образцов возбудителей заболеваний человека, но и от домашних животных, что указывает на вероятный механизм передачи детерминант резистентности от животных к человеку [33].

Действие макролидов, кетолидов, линкозамидов и стрептограмина В (группа МКЛС по названию составляющих ее препаратов) направлено на большую 50S субъединицу рибосомы, содержащей 5S и 23S рРНК и 33 рибосомных белка. Несмотря на различия в структуре, эти антибиотики имеют общий участок связывания с 50S субъединицей в непосредственной близости от пептидил-трансферазного центра. При этом они закрывают рибосомный туннель – структурный элемент, расположенный в большой субъединице рибосомы. В результате этого взаимодействия пептидил-тРНК диссоциирует из рибосомы, что приводит к нарушению транслокации, и синтез белка останавливается (рис. 8Б).

Один из механизмов устойчивости к препаратам МКЛС – продукция 23S рРНК-метилтрансфераз, которые катализируют посттранскрипционную мо-

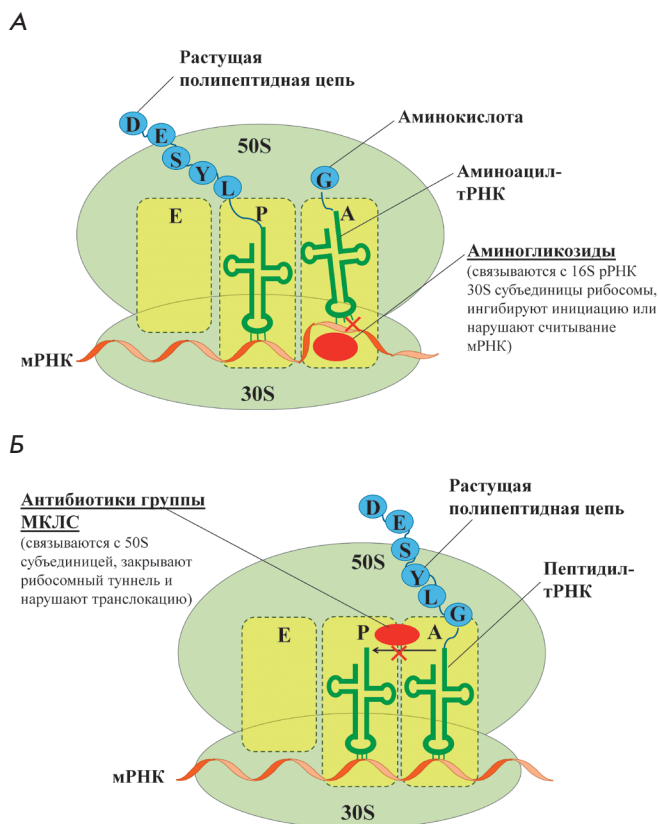


Рис. 8. Взаимодействие аминогликозидов (А) и антибиотиков группы МКЛС (Б) с рибосомой и их влияние на синтез белка

дификацию 23S рРНК, состоящую в метилировании A2058, расположенного в участке связывания антибиотика с рибосомой [35]. Донором метильной группы, как и у 16S рРНК-метилтрансфераз, является SAM. Перенос метильной группы с SAM на A2058 проходит в две стадии, включая промежуточное метилирование консервативного остатка цистеина в С-концевом домене метилтрансферазы [36]. Описано 39 генов, кодирующих 23S рРНК-метилтрансферазы, главным образом, у грамположительных микроорганизмов. У *Enterobacteriaceae* известны как хромосомные гены, например, *rlmA1*, так и локализованные на мобильных генетических элементах гены, кодирующие метилазы ErmB, ErmC, ErmD, ErmE, ErmF и Erm42. Известны конститутивный и индуцибельный типы экспрессии метилтрансфераз Erm. При конститутивном типе синтез метилтрансферазы происходит постоянно и не зависит от внешних условий. Фенотипически это проявляется в устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограминам В, кетолиды при этом сохраняют активность. При индуцибельном типе синтез метилтрансферазы про-

исходит только в присутствии МКЛС. В отсутствие индуктора регуляторная лидерная последовательность мРНК-метилтрансферазы, расположенная перед кодирующей последовательностью, имеет конформацию шпильки и не позволяет осуществить синтез фермента. Взаимодействие индуктора с регуляторной последовательностью мРНК приводит к ее перегруппировке, что вызывает синтез метилтрансферазы.

Активно ведется поиск эффективных ингибиторов рРНК-метилтрансфераз, в качестве которых предложены ингибиторы SAM-связывающего центра ферментов, имитирующие молекулу-донор метильной группы и оказавшиеся неселективными [37], и соединения, блокирующие одновременно SAM-связывающий и субстратсвязывающий центры ферментов [38].

Ферменты, участвующие в модификации пептидогликана клеточной стенки бактерий

Резистентность грамположительных бактерий к гликопептидным антибиотикам (ванкомицину и тейкопланину) обусловлена продукцией ферментов (дигидрогеназы, сериновой рацемазы, лигазы), катализирующих модификацию пептидогликана [11]. Данные антибиотики представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из гликозилированных циклических или полициклических пептидов. Они образуют комплекс с терминальным дипептидом *D-Ala-D-Ala* пептидогликана, стабильный за счет образования пяти водородных связей, и предотвращают реакции трансгликозилирования и транспептидирования в клеточной стенке (рис. 3) [39]. Резистентность к ним обеспечивается заменой последнего аминокислотного остатка *D-Ala* пептидогликана на *D-Lac* или *D-Ser*, при этом уменьшается сродство терминального дипептида к антибиотику на три порядка для *D-Ala-D-Lac* и на два порядка для *D-Ala-D-Ser* [40]. Обнаружены девять оперонов, определяющих устойчивость энтерококков к гликопептидным антибиотикам [41, 42]. Опероны *vanA*, *vanB*, *vanD* и *vanM* обеспечивают синтез предшественников пептидогликана с С-концевым дипептидом *D-Ala-D-Lac*, опероны *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* и *vanN* – с С-концевым дипептидом *D-Ala-D-Ser* [42]. Экспрессия продуктов перечисленных оперонов носит индуцибельный характер [43]. Детерминанты устойчивости к гликопептидным антибиотикам чаще локализуются на плазмидах, однако могут входить и в состав хромосомы.

Фосфоэтаноламинтрансферазы

Полимиксины (колистин) действуют на липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных

бактерий. Основной структуры данных АБП является положительно заряженный циклический полипептид, механизм действия которого сходен с механизмом катионных детергентов. Молекулы полимиксинов взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами липополисахаридов, что нейтрализует заряд мембраны и изменяет ее проницаемость для внутри- и внеклеточных компонентов. Главный механизм резистентности к полимиксинам связан с закрытием канала проникновения антибиотика в клетку, которое происходит при модификации липида А – компонента липополисахаридов фосфоэтаноломином, катализируемой фосфоэтанолламинтрансферазой (рис. 9) [44]. Ген, кодирующий данный фермент, имеет хромосомную локализацию. Недавно кодирующий фосфоэтанолламинтрансферазу ген *mcx-1* был обнаружен на плаزمиде [45]. Развитие резистентности этого типа связано с возникновением мутаций в генах фосфоэтанолламинтрансфераз [46].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ АБП

Одним из наиболее распространенных механизмов резистентности с участием ферментов является разрушение или модификация структуры антибиотика. По типу катализируемых реакций ферменты, определяющие данный механизм резистентности, делятся на гидролазы, трансферазы и оксидоредуктазы (рис. 10). Структуры основных классов АБП и позиции их ферментативной модификации представлены на рис. 11.

Гидролазы

Среди ферментов, катализирующих гидролиз антибиотиков, наиболее распространены β-лактамазы и макролидные эстеразы, разрушающие β-лактамы и макролиды соответственно. Этот же механизм определяет резистентность к фосфомицину и хлорамфениколу [5, 47].

β-Лактамазы

β-Лактамазы гидролизуют амидную связь в β-лактамном кольце, общем структурном элементе всех β-лактамных антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы). Они образуют суперсемейство ферментов, состоящее к настоящему времени из более чем 2000 представителей [47]. На основании гомологии аминокислотных последовательностей β-лактамазы разделяются на четыре молекулярных класса [48]. Ферменты классов А, С и D являются сериновыми гидролазами, ферменты класса В – металлоферментами.

Сериновые β-лактамазы имеют структурные элементы, сходные с С-доменом ПСВ, что свиде-

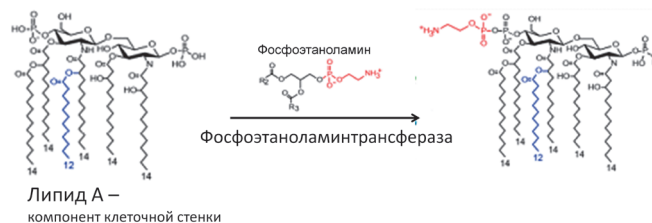


Рис. 9. Схема модификации фосфоэтанолламинтрансферазой липида А – компонента липополисахаридов наружной клеточной мембраны

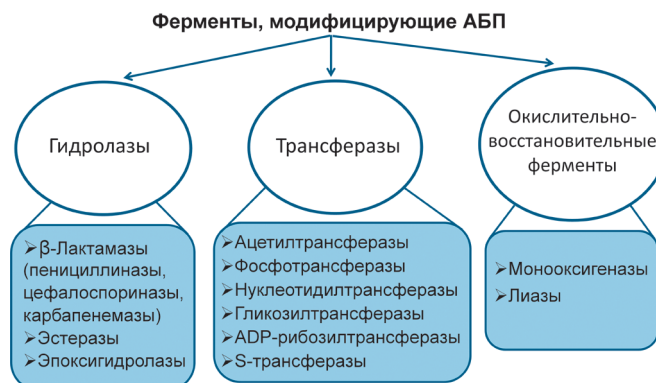


Рис. 10. Основные классы ферментов, модифицирующих АБП

тельствует об их эволюционной взаимосвязи [49]. Эволюция β-лактамаз развивается по двум основным механизмам – появлению новых мутаций в генах известных ферментов и возникновению ферментов с новой структурой. Высокая скорость мутирования β-лактамаз и локализация их генов на мобильных генетических элементах способствуют быстрому распространению устойчивых бактерий, что представляет глобальную угрозу [50]. К настоящему времени обнаружены бактерии, имеющие одновременно до восьми генов β-лактамаз [51].

Наиболее распространены β-лактамазы класса А – типа СТХ-М, ТЕМ, SHV и KPC [51]. Особенностью β-лактамаз типа ТЕМ и SHV является их мутационная изменчивость. Ключевые мутации в активном центре приводят к увеличению объема фермента и к появлению способности гидролизовать объемные молекулы цефалоспоринов II–IV поколения [52]. Эти мутантные формы получили название β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Некоторые мутации аминокислотных остатков, расположенных на удалении от активного центра, являются компенсирующими и могут иметь разнонаправленное действие на стабильность [53, 54].

β-Лактамазы класса С эффективно гидролизуют цефалоспорины. Изначально этот класс был пред-

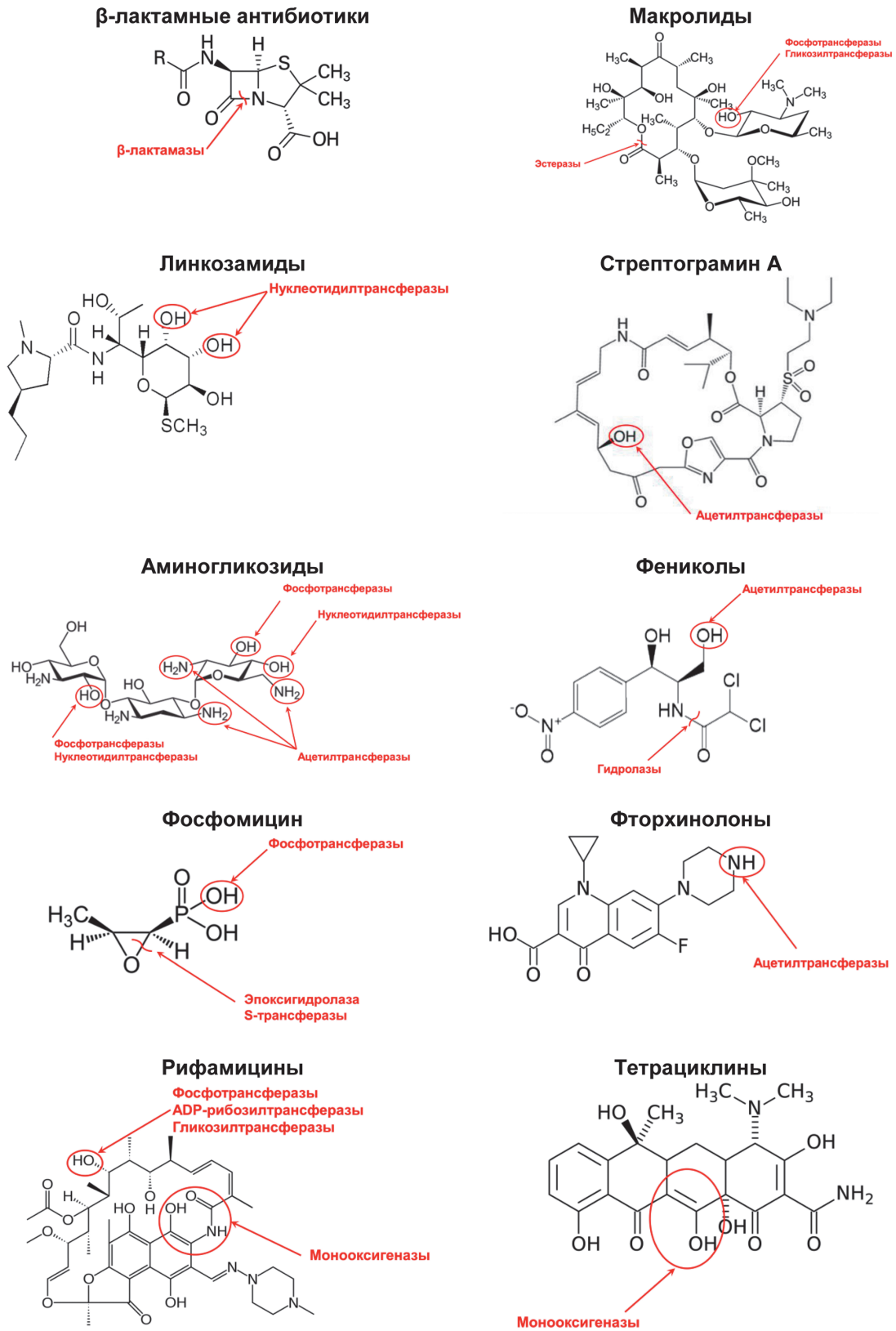


Рис. 11. Структуры основных классов АБП и модифицирующие их ферменты

ставлен ферментами, которые кодируются хромосомными генами и имеют индуцибельный тип экспрессии. Затем были обнаружены ферменты, гены которых локализованы на мобильных элементах [55].

β -Лактамазы класса D включают β -лактамазы типа ОХА и являются самыми структурно разнообразными среди сериновых β -лактамаз.

Молекулярный класс В представляет собой гетерогенное семейство металло- β -лактамаз (МБЛ) [56]. Они содержат в активном центре один или два иона цинка, гидролизуют практически все β -лактамные антибиотики, кроме монобактамов, ингибируются хелатирующими агентами (EDTA, дипиколиновая кислота и о-фенантролин). Появление новых вариантов МБЛ (например, карбапенемаз NDM-типа) и их совместная экспрессия с сериновыми β -лактамазами приводят к появлению бактерий, резистентных ко всем β -лактамным антибиотикам [57].

Для преодоления резистентности, обусловленной продукцией β -лактамаз, активно ведется поиск ингибиторов данных ферментов [58, 59]. В клинической практике для ингибирования ферментов класса А активно используются комбинации β -лактамов с клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом, которые содержат в структуре β -лактамное кольцо, образуют более стабильный ацил-ферментный комплекс и имеют низкую скорость деацилирования. К новейшим ингибиторам, имеющим структурную аналогию с β -лактамами, но не содержащим β -лактамное кольцо, относятся диазабициклооктаны (авибактам и МК-7655), образующие карбамил-ферментные комплексы с участием каталитического серина, которые далее подвергаются медленной обратимой рециклизации с освобождением молекулы ингибитора. Эти ингибиторы показали свою эффективность в отношении β -лактамаз классов А, С и частично D. Активно исследуются производные борных кислот, способные ингибировать карбапенемазы класса А. Особое внимание уделяется поиску ингибиторов МБЛ, но ни один из них пока не используется на практике [60].

Макролидные эстеразы

Резистентность к 14- и 15-членным макролидам (эритромицину, азитромицину и др.) обусловлена продукцией эстераз, катализирующих гидролиз лактонового кольца [35, 61]. Макролиды, содержащие 16-членные кольца, не являются субстратами данных ферментов. Наибольшее клиническое значение имеют эритромицинэстеразы EreA и EreB. EreA имеет более ограниченный профиль субстратной специфичности, она не гидролизует азитромицин и телитромицин. Это металлозависимый фермент, активность которого ингибируется хелатными аген-

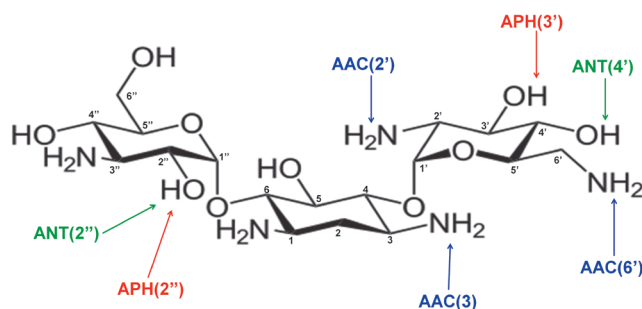


Рис. 12. Структура канамицина В и позиции его модификации аминогликозидмодифицирующими ферментами

тами. EreB обеспечивает резистентность практически ко всем 14- и 15-членным макролидам, кроме телитромицина. Гены этих эстераз локализуются на плазидах, они часто сочетаются с другими генами антибиотикорезистентности [62].

Трансферазы

Трансферазы, модифицирующие молекулы АБП ковалентным присоединением различных химических групп, представляют большое суперсемейство ферментов [5, 6, 63]. Ниже рассмотрены их основные группы, различающиеся субстратной специфичностью, типом модификации и механизмом действия.

Аминогликозидмодифицирующие ферменты

Ферментативная модификация аминогликозидных антибиотиков является наиболее распространенным механизмом резистентности, который осуществляется аминогликозидмодифицирующими ферментами (АГМФ). Известно несколько сотен различных АГМФ, практически каждый из которых представлен несколькими изоферментами, имеющими уникальную субстратную специфичность и модифицирующими аминогликозиды в определенной позиции [31]. Гены АГМФ локализуются на мобильных генетических элементах, что обуславливает их быстрое распространение.

По типу реакции выделяют три семейства АГМФ: N-ацетилтрансферазы (ААС), O-фосфотрансферазы (АРН) и O-аденилилтрансферазы (АНТ) (рис. 12). Ферменты ААС используют в качестве кофактора ацетил-КоА, донорами фосфатных групп и аденина для АРН и АНТ служат АТФ или ГТФ [23]. Ферменты ААС наиболее распространены и клинически значимы, выделено 48 вариантов ААС, способных ацетилировать аминогликозиды в одном из положений (1, 3, 2' или 6'). Также известен уникальный фермент Eis, способный ацетилировать аминогликозиды по нескольким положениям одновременно.

АРН являются вторым по численности семейством АГМФ, в котором выделяют семь типов ферментов, катализирующих перенос фосфатной группы в положения 4-, 6-, 9-, 3'-, 2''-, 3''- или 7''-аминогликозидов. Ферменты АНТ подразделяют на пять классов, способных модифицировать положения 6-, 9-, 4'-, 2''- или 3''-аминогликозидов [64, 65].

Предложено несколько подходов к преодолению резистентности к аминогликозидам: регуляция экспрессии генов антисмысловыми олигонуклеотидами [66], дизайн новых аминогликозидов [67, 68], а также поиск ингибиторов АГМФ [64, 69]. Первыми в качестве ингибиторов ААС были предложены бисубстраты, состоящие из аминогликозида и ацетил-КоА, однако из-за значительных размеров и отрицательного заряда данное соединение плохо проникало через клеточную мембрану и показало низкую эффективность в экспериментах *in vivo* [70]. Ряд последних исследований показал, что активность ААС и Eis ингибируют катионы различных металлов, что повышает эффективность аминогликозидов [71]. Для ингибирования обладающих киназной активностью АРН исследованы различные ингибиторы протеинкиназ [72]. Одним из наиболее эффективных оказался природный ингибитор кверцетин, подавляющий активность нескольких АРН *in vitro* и *in vivo*. Перспективными считаются ингибиторы, действующие на различные АГМФ, например, соединения на основе 3-(диметиламино)пропиламина с достаточной эффективностью ингибируют как АНТ, так и АРН [73]. Катионные пептиды связывались с отрицательно заряженным активным центром АГМФ и проявляли высокое сродство к различным ААС и АРН, но не действовали на резистентные бактериальные штаммы, вероятно, из-за плохой проницаемости через клеточную мембрану [74]. Димер неомицина А ингибировал активность как монофункциональных ферментов ААС(6')-Ii и АРН(3')-IIIa, так и бифункционального ААС(6')-АРН(2''), в том числе *in vivo* с использованием клинического штамма *Pseudomonas aeruginosa* [69, 75].

Ферменты, модифицирующие хлорамфеникол и его аналоги

Продукция хлорамфеникол-ацетилтрансфераз (САТ) является основным механизмом устойчивости бактерий к хлорамфениколу. Эти ферменты катализируют присоединение ацетильной группы ацетил-КоА к 3-гидроксильной группе хлорамфеникола или его синтетических аналогов (триамфеникола, азидамфеникола), препятствуя тем самым связыванию молекулы антибиотика с рибосомами [5]. САТ не инактивируют фторфеникол, поскольку в его молекуле 3-гидроксильная группа замеще-

на атомом фтора [63]. САТ разных типов обладают крайне низкой гомологией аминокислотных последовательностей, не превышающей 10%. Гены *cat* могут располагаться на хромосомах [76], но чаще локализуются на плазидах и входят в состав транспозонов в ассоциации с генами устойчивости к другим АБП. Экспрессия генов *cat* индуцируется хлорамфениколом [63].

Помимо ацетилирования инактивация хлорамфеникола может осуществляться путем О-фосфорилирования. Данный механизм антибиотикорезистентности описан у *S. venezuelae* – продуцента хлорамфеникола [77].

Ферменты, модифицирующие антибиотики группы МКЛС

Макролидные фосфотрансферазы (МРН) – ферменты, модифицирующие структуру макролидов, присоединяя фосфатную группу к 2'-ОН-группе [5]. Донором фосфатной группы служат нуклеозидтрифосфаты, преимущественно ГТР. На сегодняшний день описано семь различных ферментов этой группы. МРН предпочтительно катализируют фосфорилирование 14- и 15-членных макролидов, тогда как МРНВ модифицирует 14- и 16-членные макролиды [35, 62]. Гены, кодирующие МРН, расположены на мобильных генетических элементах, содержащих другие гены резистентности к макролидам и другим классам антибиотиков [78, 79]. Экспрессия генов макролидных фосфотрансфераз может быть как индуцибельной (*mphA*), так и конститутивной (*mphB*) [35].

Макролидные гликозилтрансферазы – ферменты, инактивирующие макролиды гликозилированием 2'-ОН-группы макролидного кольца [6]. В качестве кофактора они используют UDP-глюкозу.

Стрептограмин-ацетилтрансферазы инактивируют только стрептограмин типа А ацетилированием свободной гидроксильной группы, механизм их действия схож с механизмом САТ [5]. Гены, кодирующие эти ферменты, были идентифицированы у ряда грамположительных патогенов, включая стафилококки и энтерококки [63].

Фосфомицинмодифицирующие ферменты

Эпоксидазы FosA, FosB и FosX и киназы FomA и FomB – металлоферменты, инактивирующие фосфомицин [11, 23, 80]. Эпоксидазы раскрывают эпокси-группу фосфомицина (оксирановое кольцо), добавляя различные субстраты. FosA представляет собой глутатион-S-трансферазу, использующую в качестве кофакторов помимо глутатиона ионы металлов Mn^{2+} и K^+ . В качестве источника тиоловой группы у FosB выступает бациллитиол или L-Cys, дополнительно в качестве кофактора эти ферменты

используют Mg^{2+} [11, 81]. Фермент FosX представляет собой Mn^{2+} -зависимую гидролазу. В большинстве своем гены, кодирующие перечисленные ферменты, имеют плазмидную локализацию, хотя FosA у *P. aeruginosa* и FosB у *S. aureus* кодируются хромосомными генами.

Киназы FomA и FomB присоединяют одну или две фосфатные группы к молекуле фосфомицина, используя в качестве кофакторов АТФ и ионы Mg^{2+} . Эти ферменты выделены у продуцента фосфомицина *S. wedriensis* [11].

Рифамицинмодифицирующие ферменты

Инактивацию рифамицинов модификацией гидроксильной группы, ключевой при связывании молекулы антибиотика с β -субъединицей РНК-полимеразы, осуществляют несколько групп ферментов. NAD^{+} -зависимые ферменты группы Arr катализируют АДФ-рибозилирование, киназы RPH – фосфорилирование, гликозилтрансферазы – гликозилирование [23, 82, 83].

Моноксигеназы

Флавинозависимая моноксигеназа TetX обеспечивает резистентность ко всем тетрациклинам, включая антибиотик широкого спектра действия тигециклин [5]. TetX катализирует моногидроксилирование тетрациклинов в присутствии молекул NADPH, O_2 и Mg^{2+} , что приводит к внутримолекулярной циклизации и распаду молекулы. Флавинозависимые моноксигеназы Rox инактивируют рифамицины окислением нафтиловой группы в положении 2, что приводит к раскрытию кольца и линеаризации молекулы антибиотика [84].

Ферменты метаболических процессов, модифицирующие АБП в форме пролекарства

Модификацию антибиотиков осуществляют также ферменты, защищающие клетки от токсичных молекул. При этом в большинстве случаев происходит трансформация АБП в форме пролекарства в активную форму.

Активация изониазида происходит под действием каталазы-пероксидазы KatG с образованием свободнорадикальных форм изоникотиновой кислоты, которые блокируют ферменты, участвующие в синтезе миколовых кислот [85]. Резистентность вызвана мутациями в гене *katG*, которые наиболее часто локализованы в кодоне 315 и вызывают конформационные изменения изониазидсвязывающего кармана.

Структурные аналоги изониазида этионамид и протионамид активируются NADPH-зависимой FAD-содержащей моноксигеназой, кодируемой геном *ethA* [85]. Окисленные формы этионамида и про-

тионамида в комплексе с NAD^{+} , как и в случае изониазида, ингибируют ферменты синтеза миколовых кислот, прежде всего InhA. Экспрессия гена *ethA* регулируется транскрипционным репрессором EthR. Резистентность обусловлена мутациями в генах *ethA* и *ethR*.

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ

Мутации в бактериальных геномах и селекция новых устойчивых фенотипов являются основным механизмом возникновения резистентности бактерий к антибиотикам. В результате наблюдается широкое разнообразие форм ряда ферментов, обуславливающих резистентность, например, описано более 2000 β -лактамаз. Однако единичные аминокислотные замены вызывают ограниченные изменения активности и специфичности конкретного фермента. К новым направлениям эволюционного развития резистентности относится появление бифункциональных ферментов, кодируемых двумя сцепленными генами. Это существенно увеличивает субстратную специфичность и имеет эволюционное преимущество для обеспечения чрезвычайно широкой резистентности в отношении различных АБП [86].

Бифункциональные β -лактамазы

Первый бифункциональный фермент Trp47 был выделен из возбудителя сифилиса *Treponema palladium* [87]. Он имеет два активных центра, один из которых проявляет активность ПСБ, а второй – β -лактамазную. Поскольку Trp47 обладает очень низкой β -лактамазной активностью, она реально не обеспечивает устойчивость к β -лактамам.

Другая бифункциональная β -лактамаза blaLRA-13 обнаружена у устойчивых к β -лактамам штаммов *E. coli*, выделенных из почв Аляски [88]. Этот фермент состоит из 609 аминокислот, что почти в 2 раза больше, чем у обычной монофункциональной β -лактамазы. С-Домен данного фермента (356 аминокислот) имеет высокую степень гомологии с β -лактамазами класса С и обеспечивает резистентность к амоксициллину, ампициллину и карбенициллину, в то время как N-домен (253 аминокислоты) имеет высокую степень гомологии с β -лактамазами класса D и обеспечивает резистентность к цефалексину. Помимо blaLRA-13 выделенные штаммы продуцировали также несколько монофункциональных β -лактамаз разных классов. Хотя данная бифункциональная β -лактамаза пока не обнаружена у клинических штаммов бактерий, нельзя исключать ее распространение в будущем среди возбудителей инфекционных заболеваний человека. Более того, открытие этого фермента подтверждает эволюционную

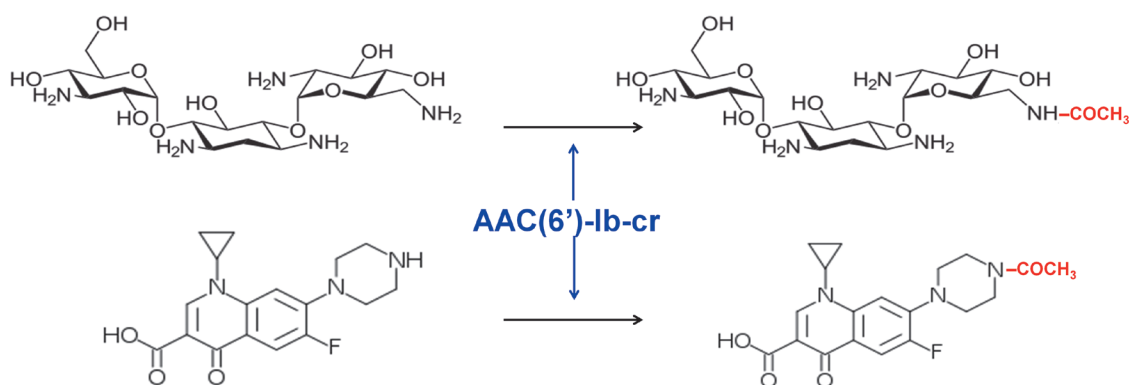


Рис. 13. Ацилирование канамицина В и ципрофлоксацина, катализируемое бифункциональным ферментом AAC(6')-Ib-cr

гипотезу о том, что микроорганизмы почвы, а также других экологических ниш, имеют широкий спектр механизмов резистентности, которые со временем могут быть переданы клинически значимым патогенам.

Бифункциональность ферментов могла возникнуть в процессе эволюционных изменений высокомолекулярных двухдоменных ПСБ, транспептидазный домен которых способен образовывать стабильный комплекс с β -лактамами антибиотиками. В процессе мутаций связывающий центр приобрел способность гидролизовать β -лактаманное кольцо, т.е. образовалась новая группа ферментов, гидролизующих антибиотики.

Бифункциональные аминогликозид-модифицирующие ферменты

У грамположительных бактерий обнаружен бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia, N-концевой домен которого имеет ацетилтрансферазную активность, а С-домен – фосфотрансферазную [89]. AAC-домен в составе фермента способен ацилировать только один вид аминогликозидного кольца, в то время как домен APH имеет более широкую специфичность, катализируя O-фосфорилирование четырех различных аминогликозидных колец [90]. Бифункциональный фермент обеспечивает устойчивость почти ко всем известным клинически значимым аминогликозидам, за исключением стрептомицина и спектиномицина.

Бифункциональный фермент ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId характеризуется сочетанием нуклеотидилтрансферазной активности в отношении стрептомицина и спектиномицина и ацетилтрансферазной активности с широкой субстратной специфичностью [91].

Первый домен бифункционального фермента AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' специфичен только в отношении гентамицина и фортимицина, второй домен проявляет широкую субстратную специфичность,

включая амикацин, дибекацин, гентамицин, изепамицин, канамицин А и неомицин [92].

Недавно из штамма *P. aeruginosa* был выделен новый бифункциональный фермент AAC(6')-30/AAC(6')-Ib', обеспечивающий устойчивость ко многим аминогликозидам, кроме изепамицина, с более высокой активностью по сравнению с монофункциональными ферментами [93].

Бифункциональный аминогликозид-и фторхинолонмодифицирующий фермент

Новый вариант ацетилтрансферазы AAC(6')-Ib-cr является первым ферментом, одновременно инактивирующим аминогликозиды и фторхинолоны (рис. 13) [94]. Две мутации, кодирующие замены W102R и D179Y, обеспечивают резистентность к ципрофлоксацину [95]. Ген этого фермента имеет как плазмидную, так и хромосомную локализацию. Он обнаружен на мультирезистентной плазмиде в сочетании с другими генами резистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос о происхождении бактериальных ферментов, формирующих резистентность в процессе эволюции, остается дискуссионным. Гены, кодирующие эти ферменты, локализируются на хромосомах и мобильных элементах. Ферменты, кодируемые хромосомными генами, предохраняют микроорганизмы-продуценты антибиотиков от модификаций потенциальных мишеней. Резистентность возникает при передаче генов данных ферментов в другие бактерии.

Другая группа ферментов, кодируемых хромосомными генами, произошла под влиянием эволюции от ферментов, входящих в состав суперсемейств с выделением подгрупп с измененной субстратной специфичностью. Ферменты, выполняющие жизненно важные функции и ответственные за биосинтез полисахаридов клеточной стенки, белков, нуклеиновых кислот и метаболитов, служат мише-

нями антибиотиков. Модификация активных центров ферментов-мишеней способствовала появлению у них способности использовать антибиотики в качестве субстратов. Установлено наличие генов проторезистентности, обуславливающих эволюционную взаимосвязь β -лактамаз и ПСБ, киназ и ацетилтрансфераз с аминокликозидмодифицирующими ферментами.

Многие ферменты произошли от бактериальных проферментов, изначально имевших другие функции. Под влиянием экзогенных и эндогенных факторов (в частности, антибиотиков и продуктов их метаболизма) в генах, кодирующих ферменты, возникали мутации, что приводило к изменению структуры, каталитических свойств и субстратной специфичности их продуктов. Множественность мутаций указывает на то, что мутациям подвергаются как ключевые аминокислотные остатки, важные для каталитических процессов, так и сопутствующие, изменения которых позволяют компенсировать структурные изменения и являются аллостерическими центрами регуляции активности.

Особенностью резистентности бактерий является разнонаправленность процессов. Совмещение нескольких механизмов устойчивости в одной клетке, включающих модификацию структурных элементов, изменение уровня экспрессии белков, в том числе поринов, активацию систем эффлюкса, затрудняет разработку методов подавления резистентности. В последние годы сложилась научная концепция объединения объектов, связанных с важнейшими биологическими процессами, в определенные группы. Так появилось понятие «микробиом» как совокупность микроорганизмов определенного вида и человека. Непатогенные микроорганизмы, в частности почвенные бактерии, представляют собой огромный резервуар и источник генов резистентности. Их широкое распространение среди микроорганизмов связано с локализацией на плаزمиде и других мобильных генетических элементах и высокой скоростью обмена и передачи между бактериальными клетками, в том числе патогенными штаммами.

Совокупность генов, обуславливающих резистентность как патогенных клинических штаммов, так и непатогенных бактерий в окружающей среде

и микробиоте, получила название «резистом». Важной особенностью является наличие в геноме одной бактерии нескольких генов резистентности, что обеспечивает их мультирезистентность. Способность бактериальных клеток к быстрому размножению, изменению структуры генов и их селекции привела к развитию новых механизмов, обеспечивающих выживаемость клеток. Важнейшую роль в этих процессах играют ферменты, выполняющие различные функции. Созданная в течение длительного эволюционного развития защитная система бактерий на основе ферментов может быть названа «энзистом».

Представленная классификация бактериальных ферментов «энзистом» будет в дальнейшем развиваться и дополняться. Обобщая результаты анализа участия ферментов в формировании резистентности бактерий к антибиотикам, следует признать фундаментальность биологического значения этого процесса, обеспечивающего выживаемость микроорганизмов и их способность к адаптации. «Приспособляемость» микроорганизмов к новым условиям окружающей среды во многом осуществляется за счет «биокаталитического функционала». Изменение этого функционала на генетическом уровне и должно, на наш взгляд, быть предметом пристального внимания микробиологов, молекулярных биологов и биотехнологов. Развитие промышленного производства АБП и их неконтролируемое использование в медицине и ветеринарии стало мощным антропогенным фактором, который оказал сильное влияние на ускорение развития резистентности. Изучение структур ферментов, составляющих «энзистом», анализ эволюционной изменчивости и консервативных участков «резистом» позволят понять механизмы регуляции бактериальных клеток и найти новые мишени для разработки рациональных подходов к созданию селективных и эффективных АБП для преодоления резистентности. Особый интерес представляет использование ферментов, способных разрушать и метаболизировать антибиотики, в качестве лекарственных средств для защиты полезной микробиоты и предотвращения побочных эффектов при лечении антибиотиками. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 15-14-00014-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. // 2014. <http://www.who.int/drugresistance/en>
2. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S., Cohen J., Findlay D., Gyssens I., Heurte O.E., et al. // *New Microbes New Infect.* 2015. V. 6. P. 22–29.
3. Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W.P. // *Evol. Appl.* 2015. V. 8. № 3. P. 240–247.
4. Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.V. // *Lancet.* 2016. V. 387. P. 176–187.
5. Wright G.D. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. № 10. P. 1451–1470.
6. Morar M., Wright G.D. // *Annu. Rev. Genet.* 2010. V. 44. № 1. P. 25–51.
7. Vollmer W., Blanot D., De Pedro M.A. // *FEMS Microbiol. Rev.*

2008. V. 32. № 2. P. 149–167.
8. Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. № 2. P. 234–258.
 9. Sauvage E., Terrak M. // *Antibiotics.* 2016. V. 5. № 1. P. 12.
 10. Bush K., Bradford P.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 8. P. 1–22.
 11. Nikolaidis I., Favini-Stabile S., Dessen A. // *Protein Sci.* 2014. V. 23. № 3. P. 243–259.
 12. Chambers H.F., Deleo F.R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. V. 7. № 9. P. 629–641.
 13. Fuda C., Suvorov M., Vakulenko S.B., Mobashery S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 39. P. 40802–40806.
 14. Diaz R., Ramalheira E., Afreixo V., Gago B. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016. V. 84. № 2. P. 135–140.
 15. Liu J., Chen D., Peters B.M., Li L., Li B., Xu Z., Shirliff M.E. // *Microb. Pathog.* 2016. V. 101. P. 56–67.
 16. Correia S., Poeta P., Hébraud M., Capelo J.L., Igrejas G. // *J. Med. Microbiol.* 2017. V. 66. № 5. P. 551–559.
 17. Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N. // *Biochemistry.* 2014. V. 53. № 10. P. 1565–1574.
 18. Hooper D.C., Jacoby G.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 9. P. 1–21.
 19. Wentzell L.M., Maxwell A. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 304. № 5. P. 779–791.
 20. Willmott C.J., Critchlow S.E., Eperon I.C., Maxwell A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 242. P. 351–363.
 21. Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 2. P. 385–392.
 22. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2009. V. 9. № 11. P. 981–998.
 23. Costa V.D., Wright G.D. // *Antimicrobial Drug Resistance / Ed. Mayers D.L.* New York: Humana Press, 2009. P. 81–95.
 24. Borukhov S., Nudler E. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. V. 6. № 2. P. 93–100.
 25. Dookie N., Rambaran S., Padayatchi N., Mahomed S., Naidoo K. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2018. V. 73. № 5. P. 1138–1151.
 26. Palomino J.C., Martin A. // *Antibiot.* 2014. V. 3. № 3. P. 317–340.
 27. Vilchèze C., Morbidoni H.R., Weisbrod T.R., Iwamoto H., Kuo M., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 14. P. 4059–4067.
 28. Larsen M.H., Vilchèze C., Kremer L., Besra G.S., Parsons L., Salfinger M., Heifets L., Hazbon M.H., Alland D., Sacchettini J.C., et al. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 46. № 2. P. 453–466.
 29. Machado D., Perdigo J., Ramos J., Couto I., Portugal I., Ritter C., Boettger E.C., Viveiros M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 8. P. 1728–1732.
 30. Wilson D.N. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. № 1. P. 35–48.
 31. Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R., Connolly L.E. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 6. P. 1–18.
 32. Doi Y., Wachino J., Arakawa Y. // *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2016. V. 30. № 2. P. 523–537.
 33. Wachino J.I., Arakawa Y. // *Drug Resist. Updat.* 2012. V. 15. № 3. P. 133–148.
 34. Hidalgo L., Hopkins K.L., Gutierrez B., Ovejero C.M., Shukla S., Douthwaite S., Prasad K.N., Woodford N., Gonzalez-Zorn B. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 7. P. 1543–1550.
 35. Fyfe C., Grossman T.H., Kerstein K., Sutcliffe J. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 10. P. 1–38.
 36. Boal A.K., Grove T.L., McLaughlin M.I., Yennawar N.H., Booker S.J., Rosenzweig A.C. // *Science.* 2011. V. 332. № 6033. P. 1089–1092.
 37. Hajduk P.J., Dinges J., Schkeryantz J.M., Janowick D., Kaminski M., Tufano M., Augeri D.J., Petros A., Nienaber V., Zhong P., et al. // *J. Med. Chem.* 1999. V. 42. № 19. P. 3852–3859.
 38. Feder M., Purta E., Kosciński L., Čubrilo S., Vlahovick G.M., Bujnicki J.M. // *ChemMedChem.* 2008. V. 3. № 2. P. 316–322.
 39. Périchon B., Courvalin P. // *Antibiotic Discovery and Development / Eds Dougherty T.J., Pucci M.J.* Boston: Springer US, 2012. P. 515–542.
 40. Courvalin P. // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 42. P. 25–34.
 41. Hegstad K., Mikalsen T., Coque T.M., Werner G., Sundsfjord A. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. V. 16. № 6. P. 541–554.
 42. Cattoir V., Leclercq R. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 4. P. 731–742.
 43. Сидоренко С.В., Тишков В.И. // *Успехи биол. химии.* 2004. Т. 44. С. 263–306.
 44. Poirel L., Jayol A., Nordmann P. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2017. V. 30. № 2. P. 557–596.
 45. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., et al. // *Lancet Infect. Dis.* 2016. V. 16. № 2. P. 161–168.
 46. Sun J., Zhang H., Liu Y.H., Feng Y. // *Trends Microbiol.* 2018. V. 26. № 9. P. 794–808.
 47. Bonomo R.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–16.
 48. Hall B.G., Barlow M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 55. № 6. P. 1050–1051.
 49. Ghuysen J.-M. // *Trends Microbiol.* 1994. V. 2. № 10. P. 372–380.
 50. Bush K., Jacoby G.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 3. P. 969–976.
 51. Bush K. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013. V. 1277. № 1. P. 84–90.
 52. Orenca M.C., Yoon J.S., Ness J.E., Stemmer W.P.C., Stevens R.C. // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8. № 3. P. 238–242.
 53. Brown N.G., Pennington J.M., Huang W., Ayvaz T., Palzkill T. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 404. № 5. P. 832–846.
 54. Grigorenko V., Uporov I., Rubtsova M., Andreeva I., Shcherbinin D., Veselovsky A., Serova O., Ulyashova M., Ishtubaev I., Egorov A. // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8. № 1. P. 117–129.
 55. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 1. P. 1–11.
 56. Bebrone C. // *Biochem. Pharmacol.* 2007. V. 74. № 12. P. 1686–1701.
 57. Nordmann P., Poirel L., Walsh T.R., Livermore D.M. // *Trends Microbiol.* 2011. V. 19. № 12. P. 588–595.
 58. Docquier J.D., Mangani S. // *Drug Resist. Updat.* 2018. V. 36. № November 2017. P. 13–29.
 59. King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C.J. // *Protein Sci.* 2016. V. 25. № 4. P. 787–803.
 60. Rotondo C.M., Wright G.D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. V. 39. P. 96–105.
 61. Morar M., Pengelly K., Koteva K., Wright G.D. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 8. P. 1740–1751.
 62. Gomes C., Martínez-Puchol S., Palma N., Horna G., Ruiz-Roldán L., Pons M.J., Ruiz J. // *Crit. Rev. Microbiol.* 2017. V. 43. № 1. P. 1–30.
 63. Schwarz S., Shen J., Kadlec K., Wang Y., Michael G.B., Feßler A.T., Vester B. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 11. P. 1–30.
 64. Zárate S., De la Cruz Claire M., Benito-Arenas R., Revuelta J., Santana A., Bastida A. // *Molecules.* 2018. V. 23. № 2. P. 284.
 65. Garneau-Tsodikova S., Labby K.J. // *Med. Chem. Comm.* 2016. V. 7. № 1. P. 11–27.
 66. Soler Bistué A.J.C., Martín F.A., Vozza N., Ha H., Joaquín J.C., Zorreguieta A., Tolmasky M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 13230–13235.
 67. Fair R.J., McCoy L.S., Hensler M.E., Aguilar B., Nizet V., Tor Y. // *ChemMedChem.* 2014. V. 9. № 9. P. 2164–2171.

68. Santana A.G., Zárate S.G., Asensio J.L., Revuelta J., Bastida A. // *Org. Biomol. Chem.* 2016. V. 14. № 2. P. 516–525.
69. Labby K.J., Garneau-Tsodikova S. // *Future Med. Chem.* 2013. V. 5. № 11. P. 1285–1309.
70. Gao F., Yan X., Auclair K. // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. № 9. P. 2064–2070.
71. Li Y., Green K.D., Johnson B.R., Garneau-Tsodikova S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 7. P. 4148–4156.
72. Shakya T., Stogios P.J., Waglechner N., Evdokimova E., Ejim L., Blanchard J.E., McArthur A.G., Savchenko A., Wright G.D. // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. № 12. P. 1591–1601.
73. Welch K.T., Virga K.G., Whittmore N.A., Özen C., Wright E., Brown C.L., Lee R.E., Serpersu E.H. // *Bioorganic Med. Chem.* 2005. V. 13. № 22. P. 6252–6263.
74. Boehr D.D., Draker K., Koteva K., Bains M., Hancock R.E., Wright G.D. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. P. 189–196.
75. Berkov-Zrihen Y., Green K.D., Labby K.J., Feldman M., Garneau-Tsodikova S., Fridman M. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. № 13. P. 5613–5625.
76. Galopin S., Cattoir V., Leclercq R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. V. 296. № 2. P. 185–189.
77. Mosher R.H., Camp D.J., Yang K., Brown M.P., Shaw W.V., Vining L.C., Mosher M., Microbiol G. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 45. P. 27000–27006.
78. Woodford N., Carattoli A., Karisik E., Underwood A., Ellington M.J., Livermore D.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. V. 53. № 10. P. 4472–4482.
79. Lee Y., Kim B.-S., Chun J., Yong J.H., Lee Y.S., Yoo J.S., Yong D., Hong S.G., D'Souza R., Thomson K.S., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 1–6.
80. Silver L.L. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. V. 7. № 2. P. 1–12.
81. Roberts A.A., Sharma S. V., Strankman A.W., Duran S.R., Rawat M., Hamilton C.J. // *Biochem. J.* 2013. V. 451. № 1. P. 69–79.
82. De Pascale G., Wright G.D. // *ChemBioChem.* 2010. V. 11. № 10. P. 1325–1334.
83. Spanogiannopoulos P., Waglechner N., Koteva K., Wright G.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 19. P. 7102–7107.
84. Koteva K., Cox G., Kelso J.K., Surette M.D., Zubyk H.L., Ejim L., Stogios P., Savchenko A., Sørensen D., Wright G.D. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. 25. № 4. P. 403–412.
85. Laborde J., Deraeve C., Bernardes-Génisson V. // *ChemMedChem.* 2017. V. 12. № 20. P. 1657–1676.
86. Zhang W., Fisher J.F., Mobashery S. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2009. V. 12. № 5. P. 505–511.
87. Cha J.Y., Ishiwata A., Mobashery S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 15. P. 14917–14921.
88. Allen H.K., Moe L.A., Rodbumrer J., Gaarder A., Handelsman J. // *ISME J.* 2009. V. 3. № 2. P. 243–251.
89. Boehr D.D., Daigle D.M., Wright G.D. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. № 30. P. 9846–9855.
90. Daigle D.M., Hughes D.W., Wright G.D. // *Chem. Biol.* 1999. V. 6. № 2. P. 99–110.
91. Green K.D., Garneau-Tsodikova S. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 6. P. 1319–1325.
92. Green K.D., Chen W., Garneau-Tsodikova S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55. № 7. P. 3207–3213.
93. Mendes R.E., Toleman M.A., Ribeiro J., Sader H.S., Jones R.N., Walsh T.R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. № 12. P. 4693–4702.
94. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Chi H.P., Bush K., Hooper D.C. // *Nat. Med.* 2006. V. 12. № 1. P. 83–88.
95. Vetting M.W., Park C.H., Hegde S.S., Jacoby G.A., Hooper D.C., Blanchard J.S. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. № 37. P. 9825–9835.