

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ АЛАРМОНСИНТЕАЗ МИКОБАКТЕРИЙ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНАЛОГОМ ЭРОГОРГИАЕНА

© 2024 Р.Ю. Сидоров^{1,2*}, А.Г. Ткаченко^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов,
Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
614000 Пермь, Пермский край, Россия; электронная почта: sidorov.r@iegt.ru

² Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614990 Пермь, Пермский край, Россия

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 09.01.2024

Принята к публикации 09.01.2024

Синтез алармонов (p)ppGpp (гуанозинтетрафосфата и гуанозинпентафосфата) вносит значительный вклад в процессы торможения метаболизма бактерий, контроля над скоростью их роста, вирулентности, бактериальной персистенции и формирования биоплёнок. Продукцию регуляторных молекул (p)ppGpp осуществляют бактериальные ферменты (p)ppGpp-синтетазы суперсемейства гомологов RelA/SpoT двух типов: длинные бифункциональные RSH-белки и малые алармонсинтетазы. В данной работе при помощи методов ферментативной кинетики и концентрационно-зависимого ингибирования исследуются детали механизма действия 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентаановой кислоты (ДМНП) в отношении белков Rel_{Msm} и RelZ, (p)ppGpp-синтезас *Mycobacterium smegmatis* обоих типов, и белка Rel_{Mtb} *Mycobacterium tuberculosis*. Обнаружена способность соединения ДМНП подавлять активность белка Rel_{Mtb}. В соответствии с результатами исследований ферментативной кинетики ДМНП проявляет себя как неконкурентный ингибитор, действующий на белки Rel_{Msm} и RelZ. Анализ молекулярного докинга позволил определить вероятное место связывания ДМНП – вблизи активного сайта синтетазного домена (p)ppGpp-синтезас. Исследование вносит вклад в разработку нового класса соединений ингибиторов алармонсинтезас, к которым относится релацин и его производные, а также изучаемое соединение ДМНП – синтетический аналог метаболита морских кораллов эрогоргиаена. В отличие от традиционных антибиотиков, ингибиторы алармонсинтезас оказывают влияние на метаболические пути, связанные со строгим ответом. Хотя эти пути не являются ключевыми для бактерий, они регулируют формирование адаптационных механизмов. Сочетание традиционных антибиотиков, действующих на растущие клетки, и новых соединений, блокирующих адаптацию микроорганизмов, потенциально способно решить актуальные проблемы резистентности к антибиотикам и бактериальной персистенции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: (p)ppGpp, алармоны, микобактерии, гомологи RelA/SpoT, малые алармонсинтетазы, ингибиторы алармонсинтезас.

DOI: 10.31857/S0320972524030019 EDN: WLOHBB

ВВЕДЕНИЕ

Механизмы адаптации бактерий способны противодействовать бактерицидному действию антибиотиков, обеспечивая выживание клеток возбудителя при лечении бактериальных инфекций. Одним из таких механизмов является персистенция – способность популяции бактерий формировать временно нерастущую субпопуляцию

клеток-персистеров, нечувствительную к антибиотикам [1]. Клетки-персистеры переживают действие антибиотика благодаря замедлению клеточного метаболизма. После окончания курса лечения антибиотиком персистеры способны возобновить растущий фенотип. В результате этого многие бактериальные инфекции, такие как туберкулёз, характеризуются рецидивирующим течением, связанным с эндогенной реактивацией болезни [2, 3].

Принятые сокращения: ДМНП – 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентаановая кислота; (p)ppGpp – гуанозинтетрафосфат и гуанозинпентафосфат; RSH – гомологи RelA/SpoT.

* Адресат для корреспонденции.

Риск рецидива способствует повышению необходимой продолжительности курса антибиотикотерапии [4]. Исследования демонстрируют, что укороченный курс терапии туберкулёза ведёт к большей доле рецидивов [5]. Кроме того, многие виды бактерий, в том числе микобактерии туберкулёза, формируют биоплёнки [6]. В глубоких слоях биоплёнок создаются условия истощения питательного субстрата, что способствует замедлению метаболизма и формированию персистерных клеток [7]. Регуляторные пути *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированные с образованием биоплёнок и персистенцией, делают вклад в формирование хронической туберкулёзной инфекции [6].

Таким образом, в терапии бактериальных инфекций возрастает потребность в новых средствах лечения, способных к преодолению механизмов адаптации бактерий. Одним из подходов к решению данных проблем может быть разработка соединений, воздействующих на строгий ответ, адаптивную реакцию бактерий на стресс, которая регулируется сигнальными молекулами алармонов гуанозинтетрафосфатом и гуанозинпентафосфатом ((p)ppGpp) [8]. Повышенные внутриклеточные концентрации алармонов ((p)ppGpp) ассоциированы с проявлениями персистенции, толерантности и резистентности у широкого диапазона видов бактерий. Напротив, устранение способности продуцировать алармоны у бактерий приводит к потере данных фенотипов [9]. Так, нокаутный штамм *M. tuberculosis* Δrel_{Mtb} , неспособный к продукции ((p)ppGpp), характеризуется сниженной толерантностью к изониазиду, нарушением адаптации к голоданию [10], нарушением способности к хронической инфекции в модели мышей и дефектом формирования биоплёнок [11]. Приведённые факты подтверждают важную роль строгого ответа в формировании свойств бактерий, затрудняющих лечение инфекции.

Синтез и гидролиз алармонов ((p)ppGpp) осуществляют преимущественно белки суперсемейства гомологов RelA/SpoT (RSH), среди которых вы-

деляют две основные группы: длинные и короткие RSH (рис. 1). Длинные гомологи RelA/SpoT – группа в основном бифункциональных ферментов, способных как к синтезу, так и к гидролизу алармонов. Короткие гомологи RelA/SpoT включают две подгруппы: малые алармонсинтетазы, способные только к синтезу алармонов, и малые алармонгидролазы, способные только к их гидролизу [12].

Соединения класса ингибиторов алармонсинтетаз, такие как релацин [13] и его производные [14–16], аскорбиновая кислота [17], GSK-X9 [10], 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)пентановая кислота (ДМНП) [18, 19], являются перспективными средствами противодействия адаптационным механизмам бактерий [20]. Ингибиторы алармонсинтетаз подавляют ((p)ppGpp)-синтезирующую активность ферментов суперсемейства RSH. Таким образом, ингибирование синтеза ((p)ppGpp) снижает клеточные процессы, индуцируемые алармонами, такие как вирулентность, образование биоплёнок и персистенция [20]. В данном исследовании проведён анализ ферментативной кинетики ((p)ppGpp)-синтетаз *Mycobacterium smegmatis* Rel_{Msm} (EC 2.7.6.5 и 3.1.7.2) и RelZ (EC 2.7.6.5) в присутствии ранее установленного ингибитора алармонсинтетаз ДМНП [18, 19]. Кроме того, проведён анализ подавления активности белка *M. tuberculosis* Rel_{Mtb} (EC 2.7.6.5 и 3.1.7.2) для дальнейшего изучения эффектов этого ингибитора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование генов *rel_{Msm}* и *relZ* *M. smegmatis* и *rel_{Mtb}* *M. tuberculosis* в экспрессионный вектор. Для продукции исследуемых белков сконструированы рекомбинантные плазмиды pET23b-*relNTD*, pET23b-*relZ* и pET23b-*rel_{Mtb}*. Вставки кодирующих последовательностей генов амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы Phusion («Thermo Fisher Scientific», США) на матрице лизата *M. smegmatis* MC²155 для генов *rel_{Msm}*

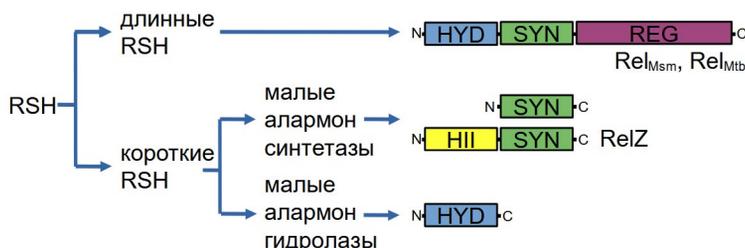


Рис. 1. Доменный состав ферментов суперсемейства RSH, катализирующих синтез и гидролиз алармонов ((p)ppGpp). Бифункциональные длинные RSH, такие как Rel_{Msm} из *M. smegmatis* и Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis*, включают гидролазный (HYD) и синтезазный (SYN) домены в каталитической доле, а также C-терминальный регуляторный домен (REG). Монофункциональные короткие RSH содержат либо гидролазный, либо синтезазный домен. RelZ из *M. smegmatis* является необычной малой алармонсинтетазой, так как содержит также домен РНКазы HII (HII)

Таблица 1. Названия и последовательности праймеров для ПЦР

Название	Последовательность (5'→3')
relMsm (pET) NdeI	gGGgGGTGACA <u>cat</u> ATGGTCGACGAGCCAG
relNTD (pET) HindIII	GTGAACACGAA <u>aAgCTt</u> CTGCGTGGCG
relZ (pET) NdeI	TGGAc <u>AtATGC</u> ACCACCCCCCGT
relZ (pET) HindIII	aGCA <u>agCTt</u> GCCCTGCAGCTTCTCGA
relMtb (pET) NdeI	aca <u>cata</u> TGGCCGAGGACCAGCTCACGGC
relMtb (pET) HindIII	tga <u>aa</u> gcttCGCGCCGAGGTCACCCGGTA
relZ seq	CGCCTCGACAAAAGTGAGCT
relMtb seq	GATGGCGGTATAGAGTGCTGACA

Примечание. Сайты рестрикции подчёркнуты, некоплементарные матрице нуклеотиды приведены в нижнем регистре.

и *relZ* либо инактивированной культуры *M. tuberculosis* H37Rv для гена *relMtb*. Праймеры для ПЦР в этом исследовании синтезированы компанией «Евроген» (Россия) (табл. 1). Пара праймеров, relMsm (pET) NdeI и relNTD (pET) HindIII, амплифицирует область *N*-терминального домена гена *relMsm* и разработана на основе публикации Jain et al. [21], где описан минимальный фрагмент белка Rel_{Msm}, сохраняющий (p)ppGpp-синтетазную активность – RelNTD. Вставка полноразмерного гена *relZ* амплифицирована с использованием праймеров relZ (pET) NdeI и relZ (pET) HindIII. Вставка кодирующей последовательности гена *relMtb* получена в реакции с праймерами relMtb (pET) NdeI и relMtb (pET) HindIII. Вставка *relNTD* клонирована напрямую в pET23b. Вставка *relZ* клонирована в промежуточный вектор pAL2 («Евроген»), вставка *relMtb* – в промежуточный вектор pTZ57R («Thermo Fisher Scientific») при помощи TA-клонирования. Для этого к вставке добавляли адениловые концы в ходе реакции с Taq-полимеразой. Клонирование в pET23b проводили путём осаждения ДНК вставки этанолом, обработки вектора и вставки рестриктазами NdeI и HindIII, а затем T4 ДНК-лигазой («Thermo Fisher Scientific»). Наличие ожидаемых вставок в pET23b верифицировано ПЦР, а затем секвенированием с использованием стандартных праймеров T7 promoter и T7 terminator, а также с праймерами, специфичными средней области соответствующих генов: relZ seq и relMtb seq. Полученными плазмидами со слиянием кодирующих последовательностей генов с *C*-терминальным 6xHisTag трансформировали штамм *Escherichia coli* BL21(DE3).

Продукция и очистка белков. Культуры *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET23b-*relNTD*, pET23b-*relZ* или pET23b-*relMtb* выращивали в пробирках со средой LB с 50 мкг/мл ампициллина до оптической плотности 0,6–1,0 при 600 нм, далее хранили при

4 °C и использовали для инокуляции в колбы. Для этого 2 мл культуры центрифугировали, осаждённые клетки ресуспендировали и переносили в колбу с 50 мл свежей среды LB с ампициллином, культивировали при 37 °C при вращении 120 об./мин. При достижении культурой оптической плотности 0,3–0,6 добавляли 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид. Спустя 3–4 ч после индукции при 30 °C культуру центрифугировали и удаляли среду. Клетки ресуспендировали в 1 мл буфера для белков (20 мМ Tris-HCl/500 мМ NaCl, pH 7,4) и разрушали при воздействии ультразвука на льду в течение 30 с по 3 раза при амплитуде 35% с перерывами в 30 с, затем центрифугировали в течение 5 мин при 15 000 *g* при 4 °C для разделения растворимой и нерастворимой фракций. Белки очищали при помощи набора HisPur Ni-NTA Spin Purification Kit («Thermo Fisher Scientific»). Растворимую фракцию белка с добавлением 5 мМ имидазола наносили на предварительно уравновешенную буфером для белков (5 мМ имидазол) центрифужную колонку с Ni-NTA-агарозой, инкубировали при мягком качении на льду в течение 30–60 мин для связывания гистидиновых меток белков с ионом никеля. Раствор с несвязавшимися белками удаляли центрифугированием 2 мин при 700 *g* и 4 °C. Затем связавшийся белок промывали 2 мл буфера для белков (25 мМ имидазол). Оставшуюся фракцию белка смывали с колонки в 3 этапа 200 мкл буфера для белков (250–500 мМ имидазол). Полученные растворы белков анализировали при помощи Ds-Na-ПААГ-электрофореза относительно стандарта Precision Plus Protein Dual Xtra («Bio-Rad», США). Концентрацию белка оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000C («Thermo Fisher Scientific»). Коэффициенты экстинкции и молекулярную массу белков рассчитывали при помощи инструмента ExPASy ProtParam.

Определение активности алармонсинтеаз.

Реакционная смесь с белком RelNTD (35 мкл) включала 40 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 27 мМ (NH₄)₂SO₄, 5%-ный метанол (v/v), 0 или 600 мкМ ДМНП, 0–3000 мкМ GTP, 4 мМ ATP, 1–2 мкМ RelNTD (0,5 ч инкубации при 37 °C) [18]. Реакционная смесь с RelZ (35 мкл) включала 40 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ MgCl₂, 500 мМ NaCl, 5%-ный метанол (v/v), 0 или 600 мкМ ДМНП, 0–4000 мкМ GDP, 4 мМ ATP, 1–2 мкМ RelZ (0,5 ч инкубации при 37 °C), согласно публикации Murdeshwar и Chatterji [22] с некоторыми модификациями. Реакции по ингибированию Rel_{Mtb} в диапазоне концентраций ДМНП проводили в условиях, описанных в публикации Singal et al. [23] с некоторыми модификациями. В реакционную смесь (70 мкл) включали 40 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреитол, 15 мМ MgCl₂, 1 мМ GTP, 4 мМ ATP, 0,5–1 мкМ Rel_{Mtb}, 0 или 5%-ный метанол (v/v), 0–600 мкМ ДМНП (0,5 ч инкубации при 37 °C). Для остановки реакции к образцам добавляли 1/10 объёма пробы 0,4 N хлорной кислоты, затем центрифугировали их при 15 000 g в течение 5 мин для удаления преципитата. Супернатант разводили в 4 раза в деионизированной воде. Концентрации нуклеотидов в образцах определяли посредством обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии по методу, описанному в литературе [18, 24]. Хроматографический анализ проводили на системе LC-20A («Shimadzu», Япония), образцы разделяли на колонке Luna C18 (5 мкм, 250 мм × 4,6 мм) («Phenomenex», США), подвижная фаза – раствор 0,5%-ного CH₃CN/99,5%-ного 50 мМ K₂HPO₄, pH 4,6. Идентификацию пиков проводили в области спектра 254 нм на основании сравнения времени удержания нуклеотидов в реакционных смесях и в растворах нуклеотидов GTP, GDP, ATP, AMP («Sigma-Aldrich», США). Активность ферментов (p)ppGpp-синтеаз количественно оценивали по изменению концентрации субстрата GTP (Rel_{Mtb}) или продукта AMP (RelNTD, RelZ).

Анализ *in silico*. База данных AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) послужила источником предсказанных трёхмерных структур (p)ppGpp-синтеаз Rel_{Mtb} (P9WHG9), Rel_{Msm} (A0QWJ6) и RelZ (A0R4I7). Инструмент Protein Structure Alignment от «Schrödinger Maestro» использовали для пространственного выравнивания белков-мишеней. Расчёты молекулярного докинга проводились с помощью сервера Blind Docking Server (<http://bio-hpc.eu/software/blind-docking-server/>).

Статистический анализ. Для визуализации и статистической обработки данных по ферментативной кинетике при помощи нелинейной регрессии использовали программу GraphPad Prism 8.0. Выбор при сравнении моделей по уравнению Михаэлиса–Ментен или уравнению Хилла осуществ-

ляли при помощи информационного критерия Акаике. Значимость различий в параметрах уравнения оценивали при помощи *t*-теста. При оценке нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Данные графиков представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, а данные в таблице параметров уравнения Хилла представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Для визуализации и статистической обработки данных по ингибированию белка Rel_{Mtb} использовали пакет Python Seaborn. При определении концентрации полумаксимального ингибирования ([I]₅₀) использовали расчёт по функции с 3 параметрами с помощью Quest Graph IC₅₀ Calculator.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ферментативная кинетика длинной (p)ppGpp-синтеазы/гидролазы Rel_{Msm}. Для изучения механизма ранее установленного ингибиторного действия ДМНП [18] проведены эксперименты по ферментативной кинетике *N*-терминального домена длинной бифункциональной (p)ppGpp-синтеазы/гидролазы Rel_{Msm}. Данный белок RelNTD имеет *N*-терминальные гидролазный и синтеазный домены, но лишён *C*-терминального регуляторного домена. Он представляет собой минимальную каталитически активную форму Rel_{Msm}, демонстрирующую повышенную (p)ppGpp-синтеазную активность [21].

Активность RelNTD анализировали в диапазоне концентраций субстрата GTP от 0 до 3000 мкМ при добавке 600 мкМ ДМНП в сравнении с контролем без ингибитора. Rel_{Msm} катализирует (p)ppGpp-синтеазную реакцию, протекающую согласно уравнению GTP/GDP + ATP ↔ ppGpp/ppGpp + AMP [25]. Скорость реакции определяли по изменению концентрации продукта AMP в реакционной смеси (рис. 2, а).

Результаты экспериментов по ферментативной кинетике демонстрируют способность ДМНП подавлять активность RelNTD (рис. 2, б). ДМНП способен к ингибированию очищенного *N*-терминального домена белка Rel_{Msm} (рис. 2, в), не теряя активности в отношении варианта белка без *C*-терминального домена. Таким образом, предполагаемое место связывания ДМНП локализуется в области синтеазного или гидролазного доменов Rel_{Msm}, но не в области регуляторного домена.

При помощи метода нелинейной регрессии произведён фиттинг уравнений зависимости скорости реакции от концентрации субстрата GTP, согласно уравнению Михаэлиса–Ментен и согласно уравнению сигмоидной кривой Хилла (рис. 2, б), и определены параметры функции (табл. 2, а).

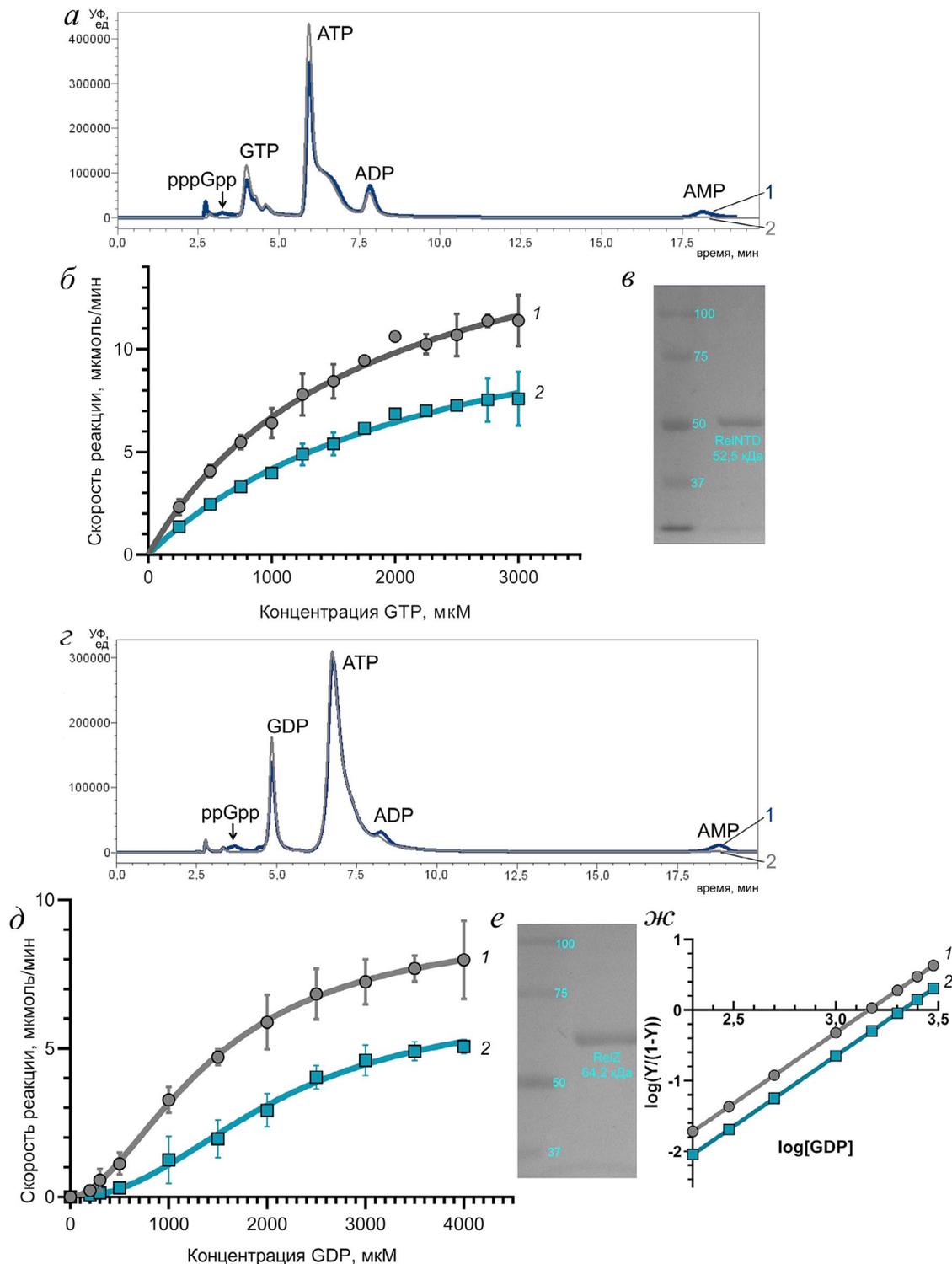


Рис. 2. Влияние ингибитора ДМНП на ферментативную кинетику (p)ppGpp-синтетаз *M. smegmatis*. *a* – Хроматографический анализ нуклеотидов в образцах, взятых из ферментативной реакции с RelNTD спустя: 1 – 0 ч или 2 – 0,5 ч (детекция при 254 нМ, 1 мМ GTP, 4 мМ ATP). *б* – Анализ ферментативной кинетики N-терминального домена белка Rel_{Msm} из *M. smegmatis*. Приведены кривые зависимости скорости реакции (расчёт на 1 мкмоль белка) от концентрации субстрата GTP: 1 – в отсутствии добавки ингибитора; 2 – при добавлении 600 мкМ ДМНП. *в* – Ds-Na-ПААГ-электрофорез очищенного фермента RelNTD. *г* – Хроматографический анализ нуклеотидов в образцах, взятых из ферментативной реакции с RelZ спустя: 1 – 0 ч или 2 – 0,5 ч (детекция при 254 нМ, 1 мМ GDP, 4 мМ ATP). *д* – Анализ ферментативной кинетики малой алармонсинтетазы RelZ из *M. smegmatis*. Приведены кривые зависимости скорости реакции (расчёт на 1 мкмоль белка) от концентрации субстрата GDP: 1 – в отсутствии добавки ингибитора; 2 – при добавлении 600 мкМ ДМНП. *е* – Ds-Na-ПААГ-электрофорез очищенного фермента RelZ. *ж* – График Хилла для реакции с RelZ: 1 – в отсутствии добавки ингибитора; 2 – при добавлении 600 мкМ ДМНП

Таблица 2. Параметры уравнения в зависимости от концентрации ингибитора ДМНП

Белок RelNTD – параметры уравнения Михаэлиса–Ментен				
Концентрация ДМНП, мкМ	V_{max} , мкмоль/мин	K^{GTP}_m , мкМ	R^2	
0	$18,5 \pm 2,3$	1760 ± 218	0,95	
600	$14,2 \pm 2,6$	2412 ± 376	0,95	
Белок RelZ – параметры уравнения Хилла				
Концентрация ДМНП, мкМ	V_{max} , мкмоль/мин	$K^{GDP}_{0,5}$, мкМ	h	R^2
0	$9,3 \pm 0,7$	1447 ± 172	$1,8 \pm 0,2$	0,97
600	$6,5 \pm 0,9$	2105 ± 310	$2,2 \pm 0,4$	0,96

Сравнение двух моделей по информационному критерию Акаике продемонстрировало большее совпадение экспериментальных данных по RelNTD с моделью по уравнению Михаэлиса–Ментен (вероятность корректности модели – 76,6% без добавки и 76,8% с добавкой ДМНП). Исследователи, ранее проводившие эксперименты по ферментативной кинетике полноразмерного белка Rel_{Msm}, обнаружили, что данные описываются уравнением Хилла [15].

Расчёт значимости различий в параметрах в отсутствии и в присутствии ДМНП по *t*-тесту показывает, что значения максимальной скорости реакции V_{max} имеют статистически значимые различия ($p = 0,01$), в отличие от константы Михаэлиса K^{GTP}_m ($p = 0,13$). Таким образом, ДМНП является неконкурентным ингибитором в отношении *N*-терминального домена длинного RSH-белка Rel_{Msm}. В то же время ранее в научных публикациях описывались ингибиторы алармонсинтетаз только с конкурентным [15] или смешанным [15, 17] типами ингибирования.

Ферментативная кинетика малой алармонсинтетазы RelZ. Помимо длинного RSH-белка Rel_{Msm}, нами исследована также ферментативная кинетика малой алармонсинтетазы *M. smegmatis* RelZ, в отношении которой ДМНП также является ингибитором [19]. Монофункциональная (p)ppGpp-синтетаза RelZ катализирует реакцию $GTP/GDP/GMP + ATP \rightarrow pppGpp/ppGpp/pGpp + AMP$. В качестве субстрата использовали GDP, к которому RelZ имеет большую аффинность по сравнению с GTP [25]. Активность RelZ анализировали в диапазоне концентраций субстрата ATP от 0 до 4000 мкМ в присутствии 600 мкМ ДМНП или в его отсутствии. Скорость реакции определяли по изменению концентрации продукта AMP (рис. 2, з).

Результаты экспериментов по ферментативной кинетике RelZ демонстрируют способность ДМНП ингибировать очищенный фермент (рис. 2, д, е). Параметры кривых зависимости скорости

реакции от концентрации субстрата также просчитаны как для уравнения Хилла (табл. 2, б), так и для уравнения Михаэлиса–Ментен. Сравнение моделей по критерию Акаике продемонстрировало большее совпадение экспериментальных данных с моделью по уравнению Хилла (вероятность корректности модели – 99,7% без добавки и 99,8% с добавкой ДМНП). ДМНП не оказывает влияние на кооперативное связывание субстрата белком RelZ (рис. 2, ж).

Расчёт по *t*-тесту значимости различий в параметрах катализируемой RelZ реакции в присутствии ДМНП или в его отсутствии (табл. 2, б) демонстрирует следующие результаты: значения V_{max} имеют статистически значимые различия ($p = 0,02$), в отличие от $K^{GDP}_{0,5}$ и коэффициента Хилла ($p = 0,07$ и $p = 0,39$ соответственно). Таким образом, ДМНП является неконкурентным ингибитором как в отношении длинной алармонсинтетазы Rel_{Msm}, так и в отношении малой алармонсинтетазы RelZ.

Анализ подавления активности Rel_{Mtb}. В результате выравнивания последовательностей аминокислот белков Rel_{Msm} и Rel_{Mtb} посредством BLASTp обнаружена высокая степень совпадений в 95%. Поэтому далее мы исследовали способность ДМНП подавлять pppGpp-синтезирующую активность Rel_{Mtb}, основной и единственной функциональной (p)ppGpp-синтетазы/гидролазы *M. tuberculosis* [26]. Результаты исследования демонстрируют способность ДМНП подавлять активность Rel_{Mtb} (рис. 3). Активность фермента снижается по мере увеличения концентрации ДМНП. Кроме того, активность Rel_{Mtb} возрастает при добавлении 5%-ного метанола приблизительно на 40%. Ранее эффект увеличения (p)ppGpp-синтезирующей активности при добавке метанола в реакционную смесь обнаруживали при анализе активности RelA [27], Rel_{Msm} [18] и RelZ [19]. Расчёт концентрации полумаксимального ингибирования $[I]_{50}$ на основании полученных данных указывает значение в 362 мкМ ДМНП. Таким образом, ДМНП способен

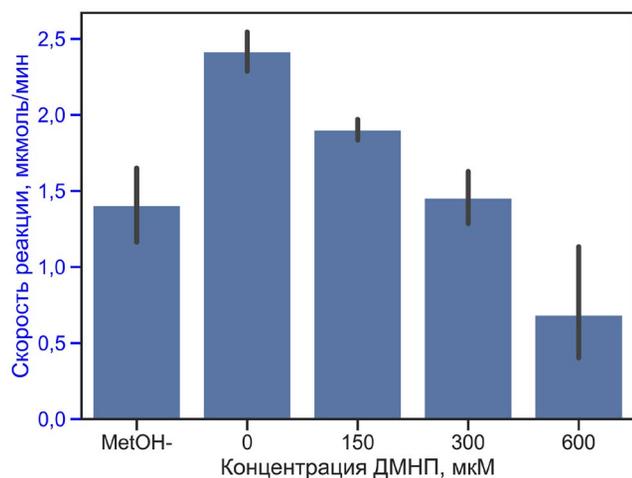


Рис. 3. pppGpp-Синтезирующая активность длинного RSH-белка Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis* в диапазоне концентраций ДМНП (0–600 мкМ) в 5%-ном метаноле. Скорость реакции оценивается по изменению концентрации субстрата GTP. MetOH- – реакция без добавки метанола и ДМНП

подавлять активность фермента строгого ответа у микобактерии туберкулёза и потому имеет потенциал применения при антибиотикотерапии туберкулёзной инфекции.

Молекулярный докинг ДМНП со структурами (p)ppGpp-синтеза, предсказанными AlphaFold.

Перспективным подходом к выявлению механизмов действия новых соединений является сочетание предсказаний структур посредством AlphaFold с моделированием молекулярного докинга для анализа взаимодействия белок-лиганд [28]. Чтобы установить вероятное место связывания ингибитора ДМНП на поверхности (p)ppGpp-синтеза, мы провели анализ с использованием молекулярного докинга *in silico*. Структуры экспериментально установленных белков-мишеней (Rel_{Mtb}, Rel_{Msm}, RelZ) были получены с помощью базы данных предсказанных структур белков AlphaFold [29]. Данные белки относятся к одному суперсемейству RSH [12] и потому характеризуются значительной долей совпадений последовательности аминокислот (Rel_{Msm} с Rel_{Mtb}: 95%; RelZ с Rel_{Msm}/Rel_{Mtb}: 29,27%). Исходя из этого, было выдвинуто предположение об общем механизме действия ДМНП в отношении исследуемых белков. В результате пространственного выравнивания трёх белков-мишеней идентифицированы области структурного сходства. Для малой алармонсинтеазы RelZ не характерны гидролазный и регуляторный домены, которые присутствуют у длинных RSH-белков Rel_{Msm} и Rel_{Mtb} [30]. В свою очередь, длинные RSH не имеют домена РНКазы НII, специфического для RelZ [22]. Структурное сходство было обнаружено в областях синтезатозного домена, характерного

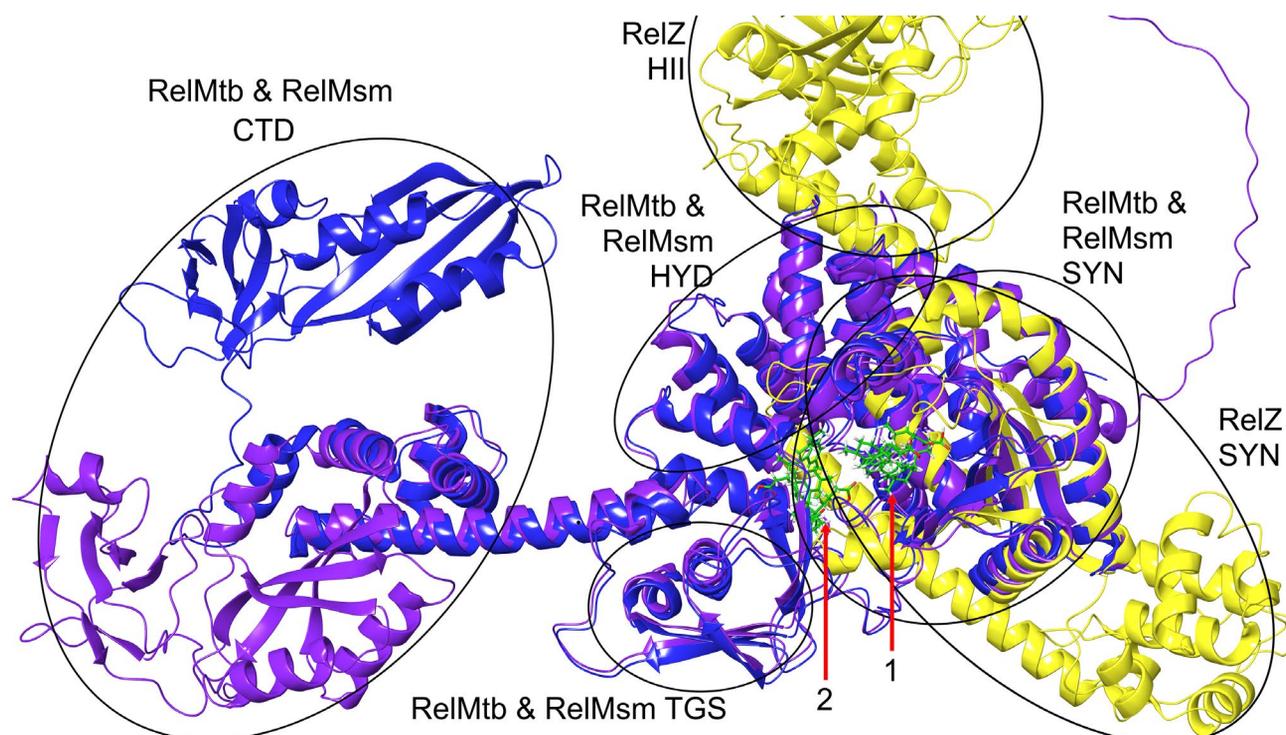


Рис. 4. Пространственное выравнивание и результаты молекулярного докинга трёхмерных структур белков-мишеней *M. tuberculosis* Rel_{Mtb} (синий), *M. smegmatis* Rel_{Msm} (фиолетовый) и RelZ (жёлтый), предсказанных AlphaFold. SYN – синтезатозный домен; HYD – гидролазный домен; CTD – регуляторный C-терминальный домен; TGS – домен TGS; HII – домен РНКазы НII. Кластеры связывания ДМНП (зелёный): 1 – соответствующий активному сайту синтезатозного домена, 2 – располагающийся вблизи активного сайта синтезатозного домена

для всех трёх белков-мишеней (рис. 4). Аминокислоты этих областей в трёхмерных структурах Rel_{Mtb}, Rel_{Msm} и RelZ были изолированы и использованы для расчётов молекулярного докинга ДМНП ко всей выделенной поверхности белков при помощи сервера Achilles Blind Docking Server [31].

По результатам расчётов выявлены вероятные сайты связывания ДМНП на поверхности белков (рис. 4). Кластер № 1 имеет эффективные энергии связывания (Rel_{Mtb}: -7,6 ккал/моль, Rel_{Msm}: -7,2 ккал/моль, RelZ: -5,4 ккал/моль) и соответствует активному центру синтетазного домена (рис. 4). В данном кластере ДМНП характеризуется взаимодействиями с аминокислотами Arg242 и Tyr309 Rel_{Mtb}, которые ответственны за связывание субстрата GTP/GDP и модификация которых приводит к потере активности [26]. Однако взаимодействие в данном сайте не согласуется с экспериментальными данными ферментативной кинетики, указывающими на неконкурентный механизм действия ДМНП, который не препятствует взаимодействию фермента с субстратом. Кластер № 2 имеет сходные энергии связывания (Rel_{Mtb}: -6,3 ккал/моль, Rel_{Msm}: -6,7 ккал/моль, RelZ: -5,8 ккал/моль) и располагается вблизи активного центра (p)ppGpp-синтетаз (рис. 4). Связывание ДМНП в данной области не препятствует связыванию субстрата, но может приводить к субоптимальной каталитической активности белков-мишеней, что согласуется с неконкурентным типом ингибирования, обнаруженным в экспериментальных исследованиях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы продемонстрировали способность ДМНП подавлять (p)ppGpp-синтезирующую активность микобактериальных белков семейства RelA/SpoT-гомологов в экспериментах с очищенными белками в условиях *in vitro*. Ингибиторная активность ДМНП исследована не только в отношении длинных RSH-белков Rel_{Msm} из *M. smegmatis* (рис. 2, б) и Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis* (рис. 3), но и в отношении короткого RSH-белка – малой алармонсинтетазы *M. smegmatis* RelZ (рис. 2, д). Несмотря на то что существование малых алармонсинтез было обнаружено сравнительно недавно [32], уже накоплен массив данных, касающихся их значимой роли в метаболизме алармонов (p)ppGpp и в адаптивных механизмах у *Staphylococcus aureus* [33], *Vibrio cholerae* [34], а также многих других видов бактерий [12]. Однако способность соединений из класса ингибиторов алармонсинтез подавлять не только длинные, но и малые алармонсинтетазы до сих пор исследована недостаточно: известно лишь то, что релацин оказался неспособен подавлять активность малой

алармонсинтетазы RelQ из *Enterococcus faecalis* [35]. Таким образом, экспериментальные данные о способности ДМНП подавлять активность малой алармонсинтетазы RelZ из *M. smegmatis* могут указывать на перспективу применения этого соединения для более полноценного подавления строгого ответа видов бактерий, имеющих, помимо длинных RSH-белков, также и малые алармонсинтетазы.

В предыдущей работе мы исследовали активность соединения ДМНП в отношении полноразмерного белка Rel_{Msm} [18], а в данной работе показана способность ДМНП подавлять активность Rel_{Msm}, лишённого регуляторного домена (RelNTD) (рис. 2, б). Тот факт, что ДМНП сохраняет свою активность в отсутствие регуляторного домена, локализует наиболее вероятное место его связывания в гидролазном или синтетазном домене Rel_{Msm} (рис. 1).

При исследовании ферментативной кинетики *N*-терминального домена Rel_{Msm} в диапазоне концентрации субстрата GTP было обнаружено соответствие данных кривой по уравнению Михаэлиса–Ментен, в то время как ферментативная кинетика полноразмерного Rel_{Msm} в данных литературы [15] соответствовала уравнению Хилла. Уравнение Хилла обычно используется для описания кинетики кооперативных ферментов с аллостерической регуляцией. Отсутствие кооперации у изолированного *N*-терминального домена Rel_{Msm} указывает на ключевую роль *C*-терминального регуляторного домена для аллостерической регуляции активности Rel_{Msm}, так как RelNTD демонстрирует неспособность к олигомеризации в отличие от полноразмерного Rel_{Msm} [21].

Алармоны связывают Rel_{Msm} в аллостерическом сайте в *C*-терминальном домене, для которого показана способность взаимодействовать с pppGpp [36]. Для Rel_{Msm} продемонстрирован механизм отрицательной обратной связи, когда pppGpp, ppGpp или pGpp подавляют его синтетическую активность [25]. Кроме того, недавние исследования обнаружили наличие аллостерического сайта связывания pppGpp между гидролазной и синтетазной областями *N*-терминального домена RelA из *E. coli* и Rel из *Bacillus subtilis*, который также участвует в положительной регуляции синтетазной активности [37].

Малая алармонсинтаза RelZ продемонстрировала сигмоидальную кинетику (рис. 2, д) с $h = 1,8 \pm 0,2$ (табл. 2, б). В растворе этот фермент существует в гексамерной форме, которая является необходимой для его активности [38]. Олигомерная структура RelZ может служить основой для кооперативного связывания. Ранее сигмоидальная кинетика наблюдалась также для малой алармонсинтетазы RelQ из *S. aureus* с коэффициентом

Хилла в диапазоне от $1,2 \pm 0,3$ до $2,1 \pm 0,4$ в зависимости от субстрата и добавленного алармона [39]. Для RelZ описано ингибирование активности посредством продукта $pppGpp$, но не $ppGpp$, который образуется при конверсии субстрата GDP [25]. Кроме того, для малой алармонсинтетазы SAS1 *B. subtilis* показана положительная регуляция посредством связывания $pppGpp$ в аллостерическом сайте [40].

Исследования ферментативной кинетики белков Rel_{Msm} и RelZ при воздействии ингибитора ДМНП в диапазоне концентраций субстрата позволили установить его тип ингибирования в отношении данных белков (рис. 2, б, д). ДМНП характеризуется неконкурентным типом ингибирования в отношении обеих алармонсинтеаз, то есть не конкурирует с субстратами GDP и GTP за активный сайт синтетазного домена (табл. 2). Описанные в литературе ингибиторы алармонсинтеаз, для которых проводились исследования ферментативной кинетики, обладают отличным от ДМНП типом ингибирования: конкурентный тип у аналога релацина AC [15], смешанный тип у витамина C [17] и аналога релацина AB [15].

В экспериментах по дозозависимому ингибированию *in vitro* установлена способность ДМНП подавлять активность синтеза $pppGpp$ фермента Rel_{Mtb} из *M. tuberculosis*. Соединение GSK-X9, для которого также установлена активность *in vitro* в отношении N-терминальной области белка Rel_{Mtb}, демонстрирует способность снижать вызываемую голоданием толерантность *M. tuberculosis* к антибиотике изониазиду [10]. Хотя ДМНП характеризуется менее эффективным значением концентрации полумаксимального ингибирования $[I]_{50}$ в 362 мкМ в сравнении с мощным ингибитором X9 ($[I]_{50} = 16$ мкМ), полученным в результате высокопроизводительного скрининга, ДМНП обладает более широким спектром установленных мишеней (р) $pppGpp$ -синтеаз микобактерий и имеет потенциал применения при разработке соединений, воздействующих на персистенцию бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод о том, что механизм действия аналога эрогоргиана ДМНП заключается в неконкурентном связывании (р) $pppGpp$ -синтеаз микобактерий. ДМНП проявляет активность в отношении длинных RSH-белков *M. smegmatis* Rel_{Msm} и *M. tuberculosis* Rel_{Mtb}, а также короткого RSH-белка малой алармонсинтетазы *M. smegmatis* RelZ, подавляя их (р) $pppGpp$ -синтезирующую активность. Таким образом, ДМНП является представителем класса ингибиторов алармонсинтеаз. Данный класс потенциально может иметь клиническое значение для борьбы с рецидивирующими бактериальными инфекциями, сложность лечения которых обусловлена, среди прочего, механизмами, ассоциированными с алармонами (р) $pppGpp$: персистенцией бактерий, толерантностью к антибиотикам и способностью к образованию биопленок.

Вклад авторов. Р.Ю. Сидоров – конструирование плазмид, наработка и выделение белков, проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, написание текста; А.Г. Ткаченко – концепция и руководство работой, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание 124020500028-4).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории органического синтеза Пермского государственного национального исследовательского университета за работу по химическому синтезу ДМНП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N. Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment, *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 320-330, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>.
2. Shao, Y., Song, H., Li, G., Li, Y., Li, Y., Zhu, L., Lu, W., and Chen, C. (2021) Relapse or re-infection, the situation of recurrent tuberculosis in Eastern China, *Front. Cell. Infect.*, **11**, 638990, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.638990>.
3. Rosser, A., Marx, F. M., and Pareek, M. (2018) Recurrent tuberculosis in the pre-elimination era, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **22**, 139-150, <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0590>.
4. Mandal, S., Njikan, S., Kumar, A., Early, J. V., and Parish, T. (2019) The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery, *Microbiology (Reading)*, **165**, 492-499, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000760>.
5. Grace, A. G., Mittal, A., Jain, S., Tripathy, J. P., Satyanarayana, S., Tharyan, P., and Kirubakaran, R. (2019) Shortened treatment regimens versus the standard regimen for drug-sensitive pulmonary tuberculosis, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **12**, CD012918, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012918.pub2>.

6. Niño-Padilla, E. I., Velazquez, C., and Garibay-Escobar, A. (2021) Mycobacterial biofilms as players in human infections: a review, *Biofouling*, **37**, 410-432, <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1925886>.
7. Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., and Singh, P. K. (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria, *Science*, **334**, 982-986, <https://doi.org/10.1126/science.1211037>.
8. Gupta, K. R., Arora, G., Mattoo, A., and Sajid, A. (2021) Stringent response in Mycobacteria: from biology to therapeutic potential, *Pathogens (Basel, Switzerland)*, **10**, 1417, <https://doi.org/10.3390/pathogens10111417>.
9. Hobbs, J. K., and Boraston, A. B. (2019) (p)ppGpp and the stringent response: an emerging threat to antibiotic therapy, *ACS Infect. Dis.*, **5**, 1505-1517, <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00204>.
10. Dutta, N. K., Klinkenberg, L. G., Vazquez, M. J., Segura-Carro, D., Colmenarejo, G., Ramon, F., Rodriguez-Miquel, B., Mata-Cantero, L., Porras-De Francisco, E., Chuang, Y.-M., Rubin, H., Lee, J. J., Eoh, H., Bader, J. S., Perez-Herran, E., Mendoza-Losana, A., and Karakousis, P. C. (2019) Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence, *Sci. Adv.*, **5**, eaav2104, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2104>.
11. Weiss, L. A., and Stallings, C. L. (2013) Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp, *J. Bacteriol.*, **195**, 5629-5638, <https://doi.org/10.1128/JB.00759-13>.
12. Atkinson, G. C., Tenson, T., and Haurlyuk, V. (2011) The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life, *PLoS One*, **6**, e23479, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>.
13. Wexselblatt, E., Oppenheimer-Shaan, Y., Kaspy, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., and Ben-Yehuda, S. (2012) Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response, *PLoS Pathog.*, **8**, e1002925, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>.
14. Wexselblatt, E., Kaspy, I., Glaser, G., Katzhendler, J., and Yavin, E. (2013) Design, synthesis and structure-activity relationship of novel Relacin analogs as inhibitors of Rel proteins, *Eur. J. Med. Chem.*, **70**, 497-504, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.036>.
15. Syal, K., Flentie, K., Bhardwaj, N., Maiti, K., Jayaraman, N., Stallings, C. L., and Chatterji, D. (2017) Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e00443-17, <https://doi.org/10.1128/AAC.00443-17>.
16. Beljantseva, J., Kudrin, P., Jimmy, S., Ehn, M., Pohl, R., Varik, V., Tozawa, Y., Shingler, V., Tenson, T., Rejman, D., and Haurlyuk, V. (2017) Molecular mutagenesis of ppGpp: turning a RelA activator into an inhibitor, *Sci. Rep.*, **7**, 41839, <https://doi.org/10.1038/srep41839>.
17. Syal, K., Bhardwaj, N., and Chatterji, D. (2017) Vitamin C targets (p)ppGpp synthesis leading to stalling of long-term survival and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **364**, fnw282, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw282>.
18. Tkachenko, A. G., Kashevarova, N. M., Sidorov, R. Y., Nesterova, L. Y., Akhova, A. V., Tsyganov, I. V., Vaganov, V. Yu., Shipilovskikh, S. A., Rubtsov, A. E., and Malkov, A. V. (2021) A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases, *Cell Chem. Biol.*, **28**, 1420-1432.e9, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.01.018>.
19. Sidorov, R. Yu., and Tkachenko, A. G. (2023) DMNP, a synthetic analog of erogorgiaene, inhibits the ppGpp synthetase activity of the small alarmone synthetase RelZ, *BIO Web Conf.*, **57**, 08002, <https://doi.org/10.1051/bioconf/20235708002>.
20. Danchik, C., Wang, S., and Karakousis, P. C. (2021) Targeting the *Mycobacterium tuberculosis* stringent response as a strategy for shortening tuberculosis treatment, *Front. Microbiol.*, **12**, 744167, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744167>.
21. Jain, V., Saleem-Batcha, R., China, A., and Chatterji, D. (2006) Molecular dissection of the mycobacterial stringent response protein Rel, *Protein Sci.*, **15**, 1449-1464, <https://doi.org/10.1110/ps.062117006>.
22. Murdeshwar, M. S., and Chatterji, D. (2012) MS_RHII-RSD, a dual-function RNase HII-(p)ppGpp synthetase from *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol.*, **194**, 4003-4014, <https://doi.org/10.1128/JB.00258-12>.
23. Singal, B., Balakrishna, A. M., Nartey, W., Manimekalai, M. S. S., Jeyakanthan, J., and Grüber, G. (2017) Crystallographic and solution structure of the N-terminal domain of the Rel protein from *Mycobacterium tuberculosis*, *FEBS Lett.*, **591**, 2323-2337, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12739>.
24. Akhova, A. V., and Tkachenko, A. G. (2019) HPLC-UV method for simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in *Mycobacterium smegmatis*, *Acta Chromatogr.*, **31**, 45-48, <https://doi.org/10.1556/1326.2017.00344>.
25. Petchiappan, A., Naik, S. Y., and Chatterji, D. (2020) RelZ-mediated stress response in *Mycobacterium smegmatis*: ppGpp synthesis and its regulation, *J. Bacteriol.*, **202**, e00444-19, <https://doi.org/10.1128/JB.00444-19>.
26. Bag, S., Das, B., Dasgupta, S., and Bhadra, R. K. (2014) Mutational analysis of the (p)ppGpp synthetase activity of the Rel enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*, *Arch. Microbiol.*, **196**, 575-588, <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0996-9>.

27. Pedersen, F. S., and Kjeldgaard, N. O. (1977) Analysis of the *relA* gene product of *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 91-97, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11573.x>.
28. Wong, F., Krishnan, A., Zheng, E. J., Stärk, H., Manson, A. L., Earl, A. M., Jaakkola, T., and Collins, J. J. (2022) Benchmarking AlphaFold-enabled molecular docking predictions for antibiotic discovery, *Mol. Syst. Biol.*, **18**, e11081, <https://doi.org/10.15252/msb.202211081>.
29. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., and Velankar, S. (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D439-D444, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
30. Steinchen, W., and Bange, G. (2016) The magic dance of the alarmones (p)ppGpp, *Mol. Microbiol.*, **101**, 531-544, <https://doi.org/10.1111/mmi.13412>.
31. Sánchez-Linares, I., Pérez-Sánchez, H., Cecilia, J. M., and García, J. M. (2012) High-throughput parallel blind virtual screening using BINDSURF, *BMC Bioinformatics*, **13**, S13, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S14-S13>.
32. Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., and Tozawa, Y. (2008) Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **67**, 291-304, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06018.x>.
33. Salzer, A., Keinhörster, D., Kästle, C., Kästle, B., and Wolz, C. (2020) Small alarmone synthetases RelP and RelQ of *Staphylococcus aureus* are involved in biofilm formation and maintenance under cell wall stress conditions, *Front. Microbiol.*, **11**, 575882, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575882>.
34. Dasgupta, S., Basu, P., Pal, R. R., Bag, S., and Bhadra, R. K. (2014) Genetic and mutational characterization of the small alarmone synthetase gene *relV* of *Vibrio cholerae*, *Microbiology (Reading)*, **160**, 1855-1866, <https://doi.org/10.1099/mic.0.079319-0>.
35. Gaca, A. O., Kudrin, P., Colomer-Winter, C., Beljantseva, J., Liu, K., Anderson, B., Wang, J. D., Rejman, D., Potrykus, K., Cashel, M., Hauryliuk, V., and Lemos, J. A. (2015) From (p)ppGpp to (pp)pGpp: characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*, *J. Bacteriol.*, **197**, 2908-2919, <https://doi.org/10.1128/JB.00324-15>.
36. Syal, K., Joshi, H., Chatterji, D., and Jain, V. (2015) Novel pppGpp binding site at the C-terminal region of the Rel enzyme from *Mycobacterium smegmatis*, *FEBS J.*, **282**, 3773-3785, <https://doi.org/10.1111/febs.13373>.
37. Roghanian, M., Van Nerom, K., Takada, H., Caballero-Montes, J., Tamman, H., Kudrin, P., Talavera, A., Dzhygyr, I., Ekström, S., Atkinson, G. C., Garcia-Pino, A., and Hauryliuk, V. (2021) (p)ppGpp controls stringent factors by exploiting antagonistic allosteric coupling between catalytic domains, *Mol. Cell*, **81**, 3310-3322.e6, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.026>.
38. Krishnan, S., Petchiappan, A., Singh, A., Bhatt, A., and Chatterji, D. (2016) R-loop induced stress response by second (p)ppGpp synthetase in *Mycobacterium smegmatis*: functional and domain interdependence, *Mol. Microbiol.*, **102**, 168-182, <https://doi.org/10.1111/mmi.13453>.
39. Yang, N., Xie, S., Tang, N. Y., Choi, M. Y., Wang, Y., and Watt, R. M. (2019) The Ps and Qs of alarmone synthesis in *Staphylococcus aureus*, *PLoS One*, **14**, e0213630, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213630>.
40. Steinchen, W., Schuhmacher, J. S., Altegoer, F., Fage, C. D., Srinivasan, V., Linne, U., Marahiel, M. A., and Bange, G. (2015) Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p)ppGpp synthetase by an alarmone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 13348-13353, <https://doi.org/10.1073/pnas.1505271112>.

THE MECHANISM OF MYCOBACTERIAL (p)ppGpp SYNTHETASE INHIBITION BY SYNTHETIC EROGORGIAENE ANALOG

R. Y. Sidorov^{1,2*} and A. G. Tkachenko^{1,2}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, the Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 614000 Perm, Russia; e-mail: sidorov.r@iegm.ru

² Perm State University, 614990 Perm, Russia

The synthesis of (p)ppGpp alarmones plays a vital role in the regulation of metabolism cessation, growth rate control, virulence, bacterial persistence, and biofilm formation. The RelA/SpoT homologs superfamily proteins are responsible for (p)ppGpp alarmone synthesis, including long bifunctional RSH proteins and small alarmone synthetases. This study employs enzyme kinetics and dose-dependent inhibition

methods to investigate the specific mechanism of action of DMNP involving Rel_{Msm} and RelZ proteins, which are (p)ppGpp synthetases in *Mycobacterium smegmatis* belonging to both types, as well as Rel_{Mtb} protein from *Mycobacterium tuberculosis*. The compound DMNP has demonstrated its capability to inhibit the activity of the Rel_{Mtb} protein. According to enzyme kinetics analysis, DMNP acts as a noncompetitive inhibitor targeting the Rel_{Msm} and RelZ proteins. Molecular docking analysis allowed to localize the DMNP binding site in proximity to the (p)ppGpp synthetase domain active site. This study advances the development of alarmone synthetase inhibitor class of compounds, which includes relacin and its derivatives, alongside the investigated compound DMNP – a synthetic analog of the marine coral metabolite erogorgiaene. Unlike the conventional antibiotics, alarmone synthetase inhibitors target metabolic pathways linked to the stringent response. Although these pathways are not essential for bacteria, they regulate the development of adaptation mechanisms. Combining the conventional antibiotics that target actively growing cells with compounds that impede bacterial adaptation may potentially address prevailing challenges associated with antimicrobial resistance and bacterial persistence.

Keywords: (p)ppGpp, alarmones, mycobacteria, RelA/SpoT homologs, small alarmone synthetases, alarmone synthetase inhibitors