

Targeting PolyP Accumulation in E. coli Using PPK Inhibitors to Disrupt Antibiotic Resistance Mechanisms

Cibler l'accumulation de polyP chez E. coli à l'aide d'inhibiteurs de PPK pour perturber les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Benejah Moleko^{1*}, Elizabeth Tsyben¹, Michael Downey¹

1. University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

*Corresponding author. Email: bmole030@uottawa.ca

Abstract | Résumé

Polyphosphates (polyP) are linear chains of inorganic phosphate (Pi) that are highly conserved among various organisms. In *Escherichia coli*, PolyP is synthesized primarily by polyphosphate kinase 1 (PPK1, encoded by *ppk*) in response to environmental stressors. PolyP contributes to bacterial survival by regulating biofilm formation, stress responses, and antibiotic resistance. The mechanisms controlling PolyP accumulation and its effects on bacterial physiology and resistance remain incompletely understood. Notably, PPK-mediated PolyP accumulation modulates lipopolysaccharide (LPS) structure, contributing to polymyxin resistance during starvation stress. Compared to the wild-type (WT) strain, Δ *ppk* mutants exhibit significant growth defects when transferred to MOPS minimal medium, whereas WT cells show minimal growth defects under this nutrient-starved condition. This differential phenotype serves as a useful readout for evaluating PPK inhibitors. Deletion of the low-affinity phosphate transporter *PitA* rescues the growth defect of Δ *ppk* mutants; this interaction is still under investigation. Different repurposed drugs act as PPK inhibitors, including mesalamine (widely used to treat inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis) and gallein (originally a histological dye and G β γ inhibitor). Both compounds inhibit bacterial PPK enzymes. In this study, we evaluated the effects of mesalamine and gallein on the growth phenotypes of four *E. coli* strains (WT, Δ *ppk*, Δ *pitA*, and the double mutant Δ *ppk* Δ *pitA*) under nutrient-starved conditions (MOPS minimal medium). Both inhibitors produced only mild, non-specific growth impairment across strains, and the result was not improved by higher concentrations of drug use. Gallein treatment showed no clear effect on PolyP levels, and polyP levels following mesalamine treatment has not been evaluated. These preliminary results highlighted the need for optimized drug delivery or alternative inhibition strategies to fully recapitulate the phenotypes of genetic PolyP deficiency.

Les polyphosphates (polyP) sont des chaînes linéaires de phosphate inorganique (Pi) hautement conservées chez divers organismes. Chez *Escherichia coli*, le PolyP est synthétisé principalement par la polyphosphate kinase 1 (PPK1, codée par *ppk*) en réponse aux facteurs de stress environnementaux. Le PolyP contribue à la survie bactérienne en régulant la formation de biofilms, les réponses au stress et la résistance aux antibiotiques. Les mécanismes contrôlant l'accumulation de polyP et leurs effets sur la physiologie et la résistance bactériennes restent incomplètement compris. Notamment, l'accumulation de polyP médiée par PPK module la structure des lipopolysaccharides (LPS), contribuant à la résistance à la polymyxine pendant le stress de famine. Comparées à la souche de type sauvage (WT), les mutants Δ *ppk* présentent des défauts de croissance significatifs lorsqu'ils sont transférés dans un milieu minimal MOPS, tandis que les cellules WT présentent des défauts de croissance minimes dans cette condition carente en nutriments. Ce phénotype différentiel sert de lecture utile pour évaluer les inhibiteurs PPK. La délétion du transporteur de phosphate à faible affinité *PitA* sauve le défaut de croissance des mutants Δ *ppk* ; Cette interaction fait toujours l'objet d'une enquête. Différents médicaments réutilisés agissent comme inhibiteurs de la PPK, notamment la mésalazine (largement utilisée pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) et la galléine (à l'origine un colorant histologique et un inhibiteur de G β γ). Les deux composés inhibent les enzymes PPK bactériennes. Dans cette étude, nous avons évalué les effets de la mésalazine et de la galléine sur les phénotypes de croissance de quatre souches d'*E. coli* (WT, Δ *ppk*, Δ *pitA*, et le double mutant Δ *ppk* Δ *pitA*) dans des conditions de manque de nutriments (milieu minimal MOPS). Les deux inhibiteurs n'ont produit qu'une légère altération de la croissance non spécifique entre souches, et cet effet n'a pas été amélioré par des concentrations plus élevées de médicaments. Le traitement par galléine n'a montré aucun effet clair sur les niveaux de polyP, et les niveaux de polyP après un traitement à la mésalazine n'ont pas été évalués. Ces résultats préliminaires ont mis en lumière la nécessité d'optimiser la délivrance de médicaments ou de stratégies alternatives d'inhibition pour reproduire pleinement les phénotypes d'une déficience génétique en polyP.