

Лукьянов Дмитрий Александрович

**Поиск новых антибиотиков.
Изучение механизма действия репомидина, тетраценомицина X и
аурапланина**

1.4.9 «биоорганическая химия»

1.5.3 «молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в центре наук о живом в Сколковском институте наук и технологии и на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

– **Остерман Илья Андреевич**
доктор химических наук

Сергиев Пётр Владимирович
доктор химических наук, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты

– **Малыгин Алексей Аркадьевич**, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции рибосом, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Никулин Алексей Донатович, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции, заместитель директора по науке Института белка РАН

Олсуфьева Евгения Николаевна – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков, ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАН

Защита диссертации состоится «06» декабря 2022 г. в 15 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о организации защиты и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/503168083/>

Автореферат разослан «___» ноября 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Агапкина Ю.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Человечество на протяжении многих веков борется с инфекционными заболеваниями. В древние времена для лечения бактериальных инфекций применяли компрессы со спорами грибов. Позднее, уже в XVI веке, Парацельс пытался использовать мышьяк для лечения сифилиса, но безуспешно. Только в XX пошел значительный прогресс в борьбе с бактериями, когда в 1929 году Александром Флемингом был открыт пенициллин. Это открытие стало началом эры антибиотиков. В последующие годы было выявлено значительное количество новых антибиотиков, так, к 1940 году было известно 6 антибиотиков, к 1960 году их число увеличилось до 1740, а к 1986 году было известно порядка 8000 антибиотиков.

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности микроорганизмов или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, протозоа) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие их развитие.

Казалось бы, при таком разнообразии известных антибиотиков подбор протокола лечения не должен вызывать затруднения, однако многие известные вещества становятся неэффективными по причине развития резистентности у бактерий. На протяжении нескольких последних лет обнаруживают все больше и больше бактерий, не восприимчивых к антибиотикам. В то же время уже известные бактерии получают антибиотическую устойчивость. Все это ведет к существенному снижению эффективности используемых антибиотиков. По известным научным данным, устойчивость к антибиотикам в наши дни становится одной из самых больших угроз среди прочих причин заболеваний. К 2050 году ожидается, что ежегодный уровень смертности от болезней, вызванных бактериями, вырастет с 0,7 (по данным на 2016 г) до 10 миллионов. Следовательно, проблема поиска новых соединений с антибиотической активностью в наши дни стоит как никогда остро. Кроме того, не менее важно понимание механизма действия соединений с антибиотической активностью.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является поиск веществ с антибиотической активностью и описание механизма их действия.

Для ее достижения поставлены следующие задачи:

1. Проведение поиска веществ с антибиотической активностью потенциальных ингибиторов синтеза белка в клетках бактерий при помощи репортерной системы pDualrep2.
 - 1.1. В библиотеках химических соединений.
 - 1.2. Среди природных источников, таких, как бактерии, в частности, родов *Actinomyces* и *Streptomyces*, а также различные виды мицелиальных грибов.
2. Подтверждение аппарата трансляции как основной мишени найденных антибиотиков при помощи набора *клеточных и бесклеточных* методов.
3. Исследование молекулярных основ взаимодействия рибосомы с антибиотиками.
4. Анализ структур антибиотик-рибосома.

Объект исследования

Объектами данного исследования являются антибиотики природного происхождения Тетраценомицин X выделенный из *Amycolatopsis* sp. A23, выделенный из *Amycolatopsis* sp. A23, Аурапланин, выделенный из *Actinoplanes* sp., VKM Ac-2862, а также

синтетическое соединение с антибактериальной активностью репомидин (1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-*a*]имидазол-1-ий хлорид), предоставленное библиотекой химических соединений InterBioScreen Ltd.

Предмет исследования

Предметом исследования данной работы являются молекулярные основы взаимодействия с рибосомой Тетраценомицина X, Аурапланина и Репомидина, а также анализ структур антибиотик-рибосома.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые был произведен высокопроизводительный поиск веществ с антибиотической активностью на роботизированной станции Janus при помощи репортерной системы pDualrep2. В ходе работы было проверено 60173 индивидуальных соединений.

При помощи данного подхода в химической библиотеке InterBioScreen был найден новый ингибитор трансляции репомидин. В работе впервые показано, что это соединение обладает антибиотической активностью, а также с помощью биохимических методов было выявлено, что рибосома является мишенью данного соединения.

Кроме того, в данной работе был описан механизм действия антибиотика природного происхождения тетраценомицина X. Ранее он упоминался в литературе, однако механизм действия был определен неверно. В данной работе впервые было показано, что тетраценомицин X является ингибитором трансляции, а не интеркалятором ДНК. В сотрудничестве с коллегами из лаборатории Д. Вилсона (Германия) была получена структура комплекса антибиотик-рибосома, что позволило определить сайт связывания антибиотика с рибосомой.

При помощи данной системы был обнаружен новый антибиотик аурапланин. Изучение механизма его действия при помощи биохимических и структурных методов показало, что аурапланин имеет новый сайт связывания с рибосомой, а также потенциально является антагонистом классического антибиотика стрептомицина.

Научная и практическая значимость исследования

В данной работе репортерная система pDualrep2 была задействована в широкомасштабном поиске химических соединений, проявляющих антибактериальную активность. Была экспериментально показана возможность проверки более 500 соединений одновременно. За время работы была оценена антибактериальная активность 60173 соединений, среди которых были отобраны вещества, ингибирующие синтез белка и вызывающие SOS-ответ в клетках бактерий.

В работе были найдены и охарактеризованы новые антибиотики – ингибиторы синтеза белка. Данные, полученные в структурных и биохимических экспериментах, открывают потенциал для дальнейшей модификации этих соединений, что в дальнейшем может быть полезно в как научно-исследовательской деятельности, так и в фармакологии.

Методология диссертационного исследования

Для решения поставленных задач был использован широкий инструментарий современных методов и подходов мирового стандарта в данной области исследований.

Для поиска соединений, проявляющих антибиотическую активность, использовалась репортёрная конструкция pDualrep2, разработанная в лаборатории ранее. Данная репортерная система использовалась как для поиска антибиотиков в культуральных жидкостях микроорганизмов (в этом случае нанесение образцов происходило вручную), так и в высокопроизводительном формате, когда образцы наносились при помощи

роботизированной станции Janus (Perkin Elmer). Следующим этапом было измерение минимальной ингибирующей концентрации на клетках *E. coli*, а также оценка цитотоксичности на наборе клеточных линий при помощи МТТ теста.

Первичное фракционирование культуральных жидкостей производилось методом колоночной хроматографии, дальнейшее фракционирование проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Способность исследуемого вещества подавлять трансляцию исследовали при помощи наборов «*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates» (Promega, США) и PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США). Тоупринтинг проводили по протоколу, описанному Орелле с соавторами в работе 2013 года.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Репоминцин (1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид) является ингибитором бактериального роста, мишенью которого является аппарат синтеза белка
2. Антибиотик Тетраценомицин X является ингибитором синтеза белка, связывающимся в пептидном туннеле рибосомы.
3. Обнаружен новый антибиотик - Аурапланин ((*Z*)-5-бензил-3-((2E,4E,6E)-1,9-дигидрокси-8-метилдека-2,4,6-триен-1-илиден)-5-гидрокси-1-метилпирролидин-2,4-дион).
4. Аурапланин подавляет синтез белка, связываясь с рибосомой в уникальном сайте, не характерном для других ингибиторов трансляции.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования определяется достаточным объемом проведенных исследований и воспроизводимостью экспериментов. Экспериментальные процедуры соответствуют поставленным задачам и целям. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на 8-ти конференциях, различного уровня (3 из которых международные), а именно:

1. 45th FEBS Congress, 2021, Любляна, Словения.
2. Russian International Conference On Cryoelectron Microscopy (RICCEM), 2021, Москва, Россия.
3. Четыре Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», 2018, 2020, 2021, 2022 гг., Москва, Россия.
4. Gen-Y, 2018, Сочи, Россия.
5. 43th FEBS Congress, 2018, Прага, Чехия.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

В публикации [1] автор принимал участие в постановки задач, выполнении экспериментов, анализе данных, подготовке публикации, включая переписку с редакцией и рецензентами. В публикациях [2] автор принимал участие в постановки задач, выполнении экспериментов (в том числе по выделению активного вещества, постановке экспериментов на клетках, выполнению тоупринтинг анализов). В научных публикациях [3-6] автор принимал участие в постановки задач, выполнении экспериментов и анализе данных (по

части экспериментов выполненных с двойной репортерной системой). В публикациях [7-10] автор принимал участие в постановки задач, выполнении экспериментов, анализе данных, подготовке публикации.

Личный вклад автора

Все используемые данные были получены автором лично или при его непосредственном участии, включая планирование экспериментов, анализ полученных данных, подбор и анализ данных литературы. Междисциплинарные работы были сделаны большой группой авторов, что отражено в публикациях. Автор принимал непосредственное участие в выборе пути исследования, а также занимался обобщением экспериментальных данных и представлении полученных результатов. Часть экспериментальных исследований проводилась магистрами Центра наук о живом Сколковского института науки и технологии Лисевич И. М. и Тинаше П.М. при непосредственном участии автора.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах и состоит из следующих разделов: «Список сокращений», «Список публикаций», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и «Список литературы». Работа содержит 13 таблиц и 69 рисунков. Библиография включает 193 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Вещества с антибактериальной активностью, найденные в химических библиотеках

Для высокопроизводительного поиска веществ была использована роботизированная станция «Janus» («Perkin-Elmer»), находящаяся в ЦКП МГУ. С помощью этой станции возможно переносить по 96 образцов одновременно (Рисунок 1).



Рисунок 1. Алгоритм поиска веществ с антибиотической активностью при помощи роботизированной станции «Janus».

Используя описанный выше подход возможно производить проверку до 1500 соединений за один запуск станции, при этом с учетом всех подготовительных этапов такой запуск станции занимает не более 7-8 часов. В данной работе представлены результаты проверки 60173 индивидуальных соединений, предоставленных химическими библиотеками InterBioScreen (27337) и ChemDiv (32836). Среди проверенных соединений активность на штамме *E. coli JW5503 $\Delta tolC$* показали 10280 соединений (17,1% от всех соединений). Из соединений проявивших активность 6078 (10,1% от всех соединений) не индуцировали репортер, 2738 (4,5% от всех соединений) индуцировали трансляционную часть репортерной системы, 992 (1,6% от всех соединений) индуцировали SOS-ответную часть репортерной системы, 395 (0,7% от всех соединений) индуцировали обе части репортерной системы и 77 соединений показали активность против клеток дикого типа *E. coli BW25113* (Рисунок 2).

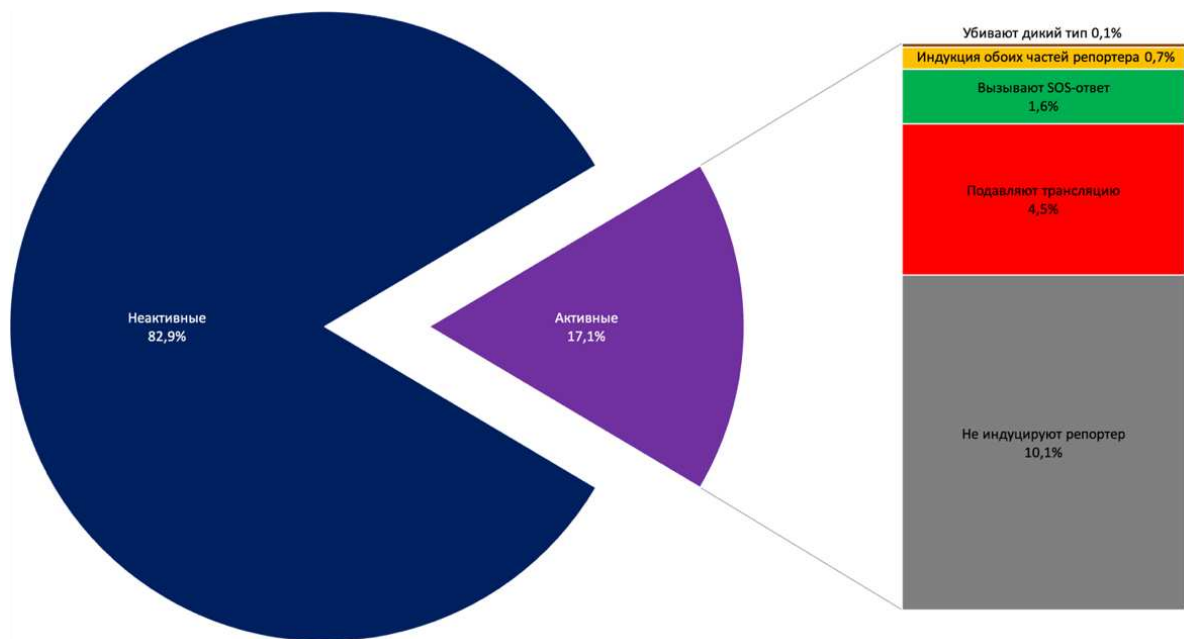


Рисунок 2. Активность протестированных в ходе поиска соединений.

Новый ингибитор производное имидазола

В ходе высокопроизводительного поиска веществ с антибиотической активностью библиотеке химических соединений, предоставленных компанией InterBioScreen Ltd, среди веществ, проявляющих антибиотическую активность, найдена молекула репомидин [1] подавляющая рост репортерного штамма *E. coli* JW5503 и индуцирующая экспрессию гена *Katushka2S*, свойственную трансляционным ингибиторам (Рисунок 3, B).

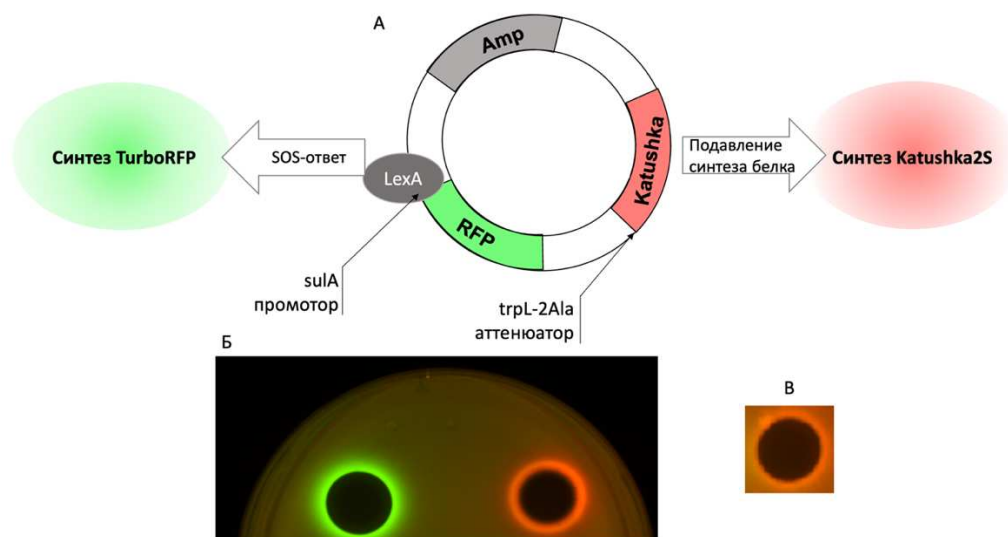


Рисунок 3. А – строение репортерной плазмиды pDualrep2. Б – индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам трансляции или веществам, повреждающим ДНК. Капли эритромицина (справа, 2 мкг), левифлоксацина (слева, 0.05 мкг) наносили на поверхность чашки с агаром, содержащей клетки *E. coli* JW5503, трансформированные плазмидой pDualrep2. Экспрессия *Katushka2S* (красный) запускается ингибиторами трансляции, а экспрессия TurboRFP (зеленый) индуцируется при повреждении ДНК. В – индукция двойной репортерной системы репомидином (1-(2-оксо-

2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлоридом) (30 мкг)

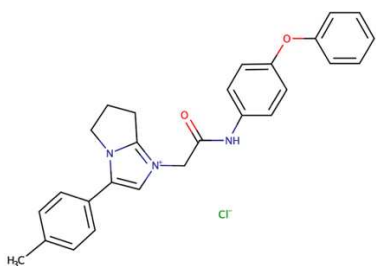


Рисунок 4. Структурная формула репомецина (1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида, STOCK4S-33513).

Сводная характеристика веществ, структурно похожих на репомецин

Данная молекула была найдена в ходе скрининга химической библиотеки Интербиоскрин. Информации о биологических тестах данной молекулы в открытых источниках не обнаружено.

Далее был сделан поиск похожих молекул по базе данных pubchem с порогом по Танимото в 90%. Однако среди 79 найденных молекул ни одна не проверялась на биологическую активность против клеток бактерий.

Измерение минимальной ингибирующей концентрации

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом последовательных разведений на штамме *E. coli* JW5503 с делецией гена *tolC*. Минимальная ингибирующая концентрация репомецина составила 3.1 мкг/мл.

Измерение цитотоксичности на эукариотических клетках

Токсичность данного соединения была проверена на культурах клеток человека HEK293T, MCF7, A549, Va-13 в МТТ-тесте. Данная молекула оказалась токсичной в диапазоне 0,2-1,8 мкг/мл, что ниже токсичности для бактериальных клеток.

Трансляция в бесклеточной системе

Реакцию трансляции в бесклеточной системе проводили с использованием набора *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates от компании Promega. Антибиотик использовался в концентрации 200 мкг/мл, в качестве контроля использовался растворитель ДМСО, на него же и нормировались результаты. Уровень трансляции в присутствии антибиотика составил 0,2% от контроля, что свидетельствует о полном ингибировании трансляции этим соединением.

Анализ места остановки рибосом

Метод тоупринтинга позволяет не только подтвердить, является ли соединение ингибитором синтеза белка или нет, но и дает возможность предположить, на каком именно этапе произошла остановка трансляции. Суть метода состоит в том, что в бесклеточной системе, основанной на индивидуально выделенных компонентах трансляции, в присутствии исследуемого вещества синтезируется короткий пептид. К реакционной смеси добавляется радиоактивно меченный праймер, комплементарный 3'-концевому участку мРНК, РНК-зависимая-ДНК-полимераза и 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. После этого происходит удлинение праймера по матрице РНК до тех пор, пока РНК-зависимая-ДНК-полимераза не встретится с рибосомой или не дойдет до конца матрицы. Если в смесь добавлен ингибитор синтеза белка, то рибосома остановится на матрице и не позволит РНК-

зависимой-ДНК-полимеразе дойти до конца матрицы и фрагмент кДНК будет коротким. Точную длину фрагмента кДНК и место остановки рибосомы на мРНК можно рассчитать, исходя из последовательности РНК и положения продукта обратной транскрипции в геле относительно продуктов секвенирования по Сэнгеру, разделяемых в соответствующих дорожках геля. Был проведен расчет кодонов, которые были в Р-сайте на момент остановки рибосомы (Рисунок 5). Этими кодонами оказались 1-AUG (M), 2-UAU (Y), 8-CAG (Q). Однако если посмотреть на контроль без добавления антибиотика DMSO, то можно увидеть те же небольшие остановки на тех же местах, но менее выраженные. Это позволяет выдвинуть гипотезу, согласно которой данный ингибитор трансляции может влиять на кинетику синтеза белка на участках мРНК, которые рибосома проходит с большим трудом.

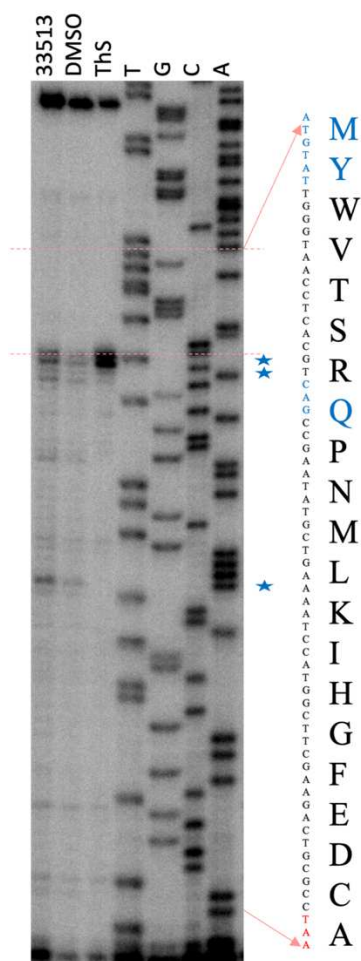


Рисунок 5. Схема тоупринт-анализа на матрице RST1. 33513 – система трансляции с добавлением исследуемого вещества – 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) в концентрации 200 мкг/мл. DMSO – отрицательный контроль (DMSO 1%); ThS – в систему трансляции добавлен контрольный антибиотик тиострептон в концентрации 50 мкМ (останавливает трансляцию на старт-кодоне), Т, G, А, С – секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах.

Вещества с антибактериальной активностью, найденные в природных источниках

Для поиска веществ с антибиотической активностью в природных образцах применяется следующий алгоритм работы, на первом этапе проводится разделение культуральной жидкости при помощи твердофазной экстракции на сорбенте LPS-500-H, далее производится очистка при помощи ВЭЖХ. Затем производится идентификация массы активного соединения методом высокоточной масс-спектрометрии. В значительной части случаев уже на этом этапе получается выявить активную молекулу путем поиска брутто-формулы по химическим базам данных. Однако если данных, полученных описанными выше методами недостаточно для однозначной идентификации соединения, то на следующем шаге используется метод ядерного магнитного резонанса (Рисунок 6).

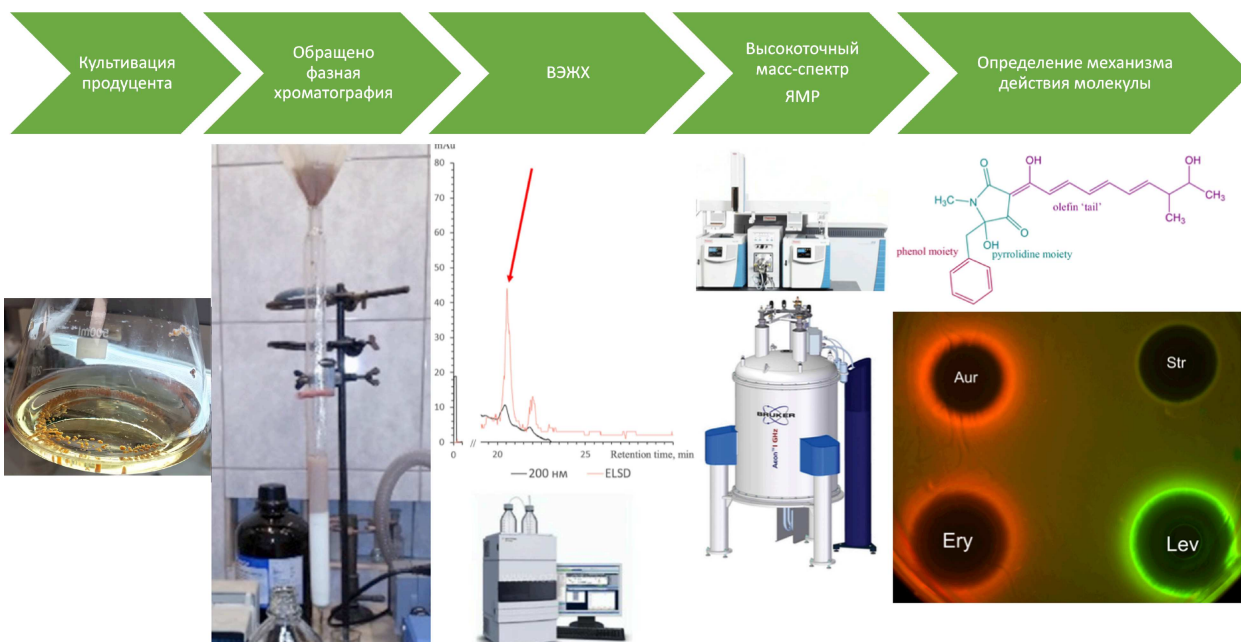


Рисунок 6. Идентификация активного соединения из образцов природного происхождения.

При помощи данной репортерной системы было проведено несколько поисковых исследований, по результатам которых получилось найти новые модификации ранее известных молекул, а также новые штаммы продуценты.

В частности, было охарактеризовано несколько штаммов эндофитных актинобактерий из выделенных из мангровых растений. В общей сложности 101 штамм эндофитных актинобактерий был выделен. Среди них семь штаммов были потенциально новыми видами родов *Nocardioideis*, *Streptomyces*, *Amnibacterium*, *Marmoricola* и *Mycobacterium*. Прежде всего, штамм 8VXZ-J1 уже был охарактеризован как новый вид рода *Marmoricola*. В общей сложности 63 из 101 штамма были отобраны для скрининга антибактериальной активности методом бумажно-дисковой диффузии и ингибиторов биосинтеза рибосом и ДНК с помощью двойной репортерной системы pDualrep2. Тридцать один штамм показал положительные результаты как минимум в одном антибактериальном тесте. Так же было обнаружено, что штаммы *Streptomyces* 2BBP-J2 и 1BBP-1 продуцируют соединение, ингибирующее синтез белка. В то же время штамм *Streptomyces* 3BQP-1 продуцирует биоактивное соединение, вызывающее SOS-ответ в клетках бактерий (Рисунок 7). Было показано, что мангровые растения содержат большое разнообразие культивируемых эндофитных актинобактерий, которые могут быть многообещающим источником для открытия новых видов и биологически активных соединений [6].

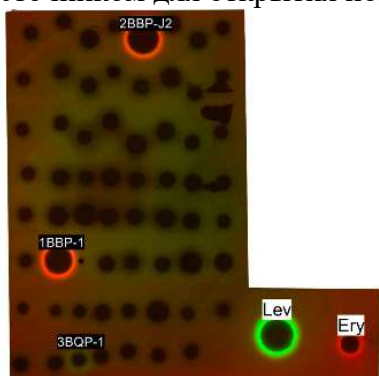


Рисунок 7. Индукция двойной репортерной системы pDualrep2, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или веществам, вызывающим SOS-ответ. Капли эритромицина (ERY), левофлоксацина (LEV) и тестируемых соединений помещали на поверхность чашки с агаризованной средой, содержащей клетки *E. coli* ΔtolC, трансформированные репортерной плазмидой pDualrep2.

Далее работа была продолжена с еще десятью образцами мангровых почв из Футяня и Маовэйхая Китая. В общей сложности 539 культивируемых актинобактерий были

выделены и распределены по 39 родам, относящимся к 18 семействам 8 порядков, путем сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S рРНК. На основании генотипического анализа и фенотипических характеристик 115 из 539 штаммов актинобактерий были выбраны в качестве репрезентативных штаммов для проверки их антибактериальной активности против бактерий «ESKAPE» методом диффузии в агар и антибактериального механизма с помощью репортерной системы рDualrep2. Пятьдесят четыре штамма 23 родов, включая 2 потенциально новых вида, проявили антагонистическую активность в антибактериальном анализе. Между тем, 5 штаммов 3 родов содержали соединения ингибирующие синтез белка (Рисунок 8), что еще раз подтверждает, что мангровые почвы являются резервуаром штаммов способных синтезировать потенциально полезные вторичные метаболиты [5].

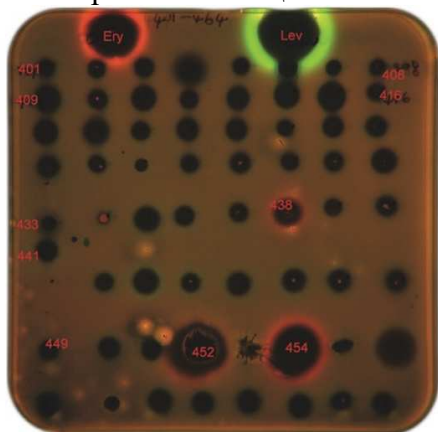
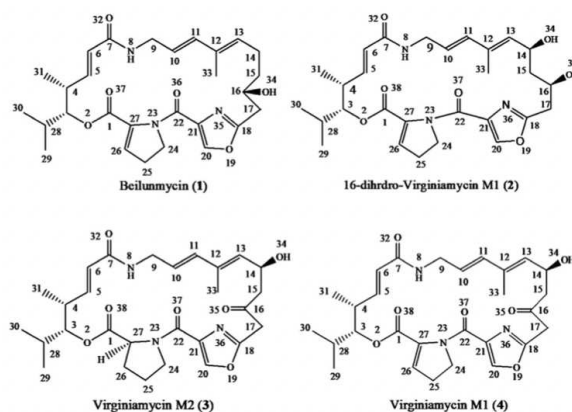


Рисунок 8. Индукция двойной репортерной системы рDualrep2, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или веществам, вызывающим SOS-ответ. Капли эритромицина (ERY), левофлоксацина (LEV) и тестируемых соединений помещали на поверхность чашки с агаризованной средой, содержащей клетки *E. coli* ΔtolC, трансформированные репортерной плазмидой рDualrep2.

В продолжении работы с актинобактериями выделенными из мангровых растений был взят штамм эндофитных *Streptomyces* sp. 2BVP-J2. В результате разделения КЖ этого штамма получены одно новое производное виргиниамицина, «бейлунмицин» (1), и три известных виргиниамициновых антибиотика, 16-гидрокси-виргиниамицин M1 (2), виргиниамицин M2 (3) и виргиниамицин M1 (4). Структуры были охарактеризованы на основе их спектроскопических данных (Рисунок 9). Соединения 1–4 проявляли антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий со значениями МИК в диапазоне 0,5–16 мкг/мл. Все соединения ингибировали трансляцию белка в репортерной системе рDualrep2 в концентрациях 1,9–5,9 нмоль (Рисунок 10) [3].

Рисунок 9. Структуры соединений 1–4, выделенных из *Streptomyces* sp. 2BVP-J2.



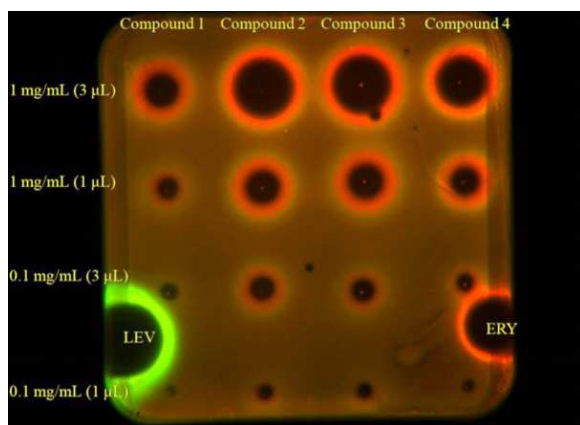


Рисунок 10. Определение минимальных концентраций соединений 1–4, которые можно обнаружить с помощью pDualrep2. Капли по 3 мкл соединения 1 и 1 мкл соединений 2–4, протестированные в концентрации 1,0 мг/мл, показали индукцию экспрессии *Katushka2S*. Капли 2 мкл эритромицина (0,5 мг/мл) и левофлоксацина (0,05 мг/мл) использовали в качестве положительных контролей для ингибиторов биосинтеза белка и индукторов SOS-ответа.

Другое исследование, проведенное при помощи данной репортерной системы было посвящено поиску и описанию актиномицетов из пустыни Такла-Макан. В общей сложности 590 культивируемых штаммов актинобактерий были выделены. Сто сорок шесть изолятов актинобактерий были выбраны в качестве представителей для оценки антибактериальной активности и механизма действия методом диффузии с бумажным диском и системой двойного флуоресцентного белка-репортера «pDualrep2» соответственно. В общей сложности 61 изолят проявлял антагонистическую активность в отношении протестированных патогенов «ESKAPE», среди которых семь штаммов могли продуцировать биоактивные метаболиты, способные либо блокировать аппарат трансляции, либо индуцировать SOS-ответ в системе pDualrep2. Примечательно, что *Saccharothrix* sp. 16Sb2-4, обладающий многообещающим антибактериальным потенциалом с механизмом вмешательства в трансляцию белка, был детально проанализирован, чтобы получить более глубокое представление о его биоактивных метаболитах. При помощи сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) были выделены и в дальнейшем охарактеризованы при помощи высокоточной масс-спектрометрии (QToF)-MS/MS и идентификации четыре семейства соединений (1–16). Последующее разделение под контролем биоанализа привело к очистке четырех 16-членных макролидных антибиотиков, альдгамицина Н (8), альдгамицина К (9), альдгамицина G (10) и свалпамицина В (11), и их структуры были выяснены с помощью высокоточной масс-спектрометрии (ESI)-МС и ЯМР-спектроскопии (Рисунок 11). Все соединения 8–11 проявляли антибактериальную активность, ингибируя синтез белка в системе pDualrep2 (Рисунок 12). Таким образом можно заключить, что пустыня Такла-Макан является потенциально уникальным резервуаром разнообразных актинобактерий, которые могут быть многообещающим источником для открытия новых видов и разнообразных биологически активных соединений [3].

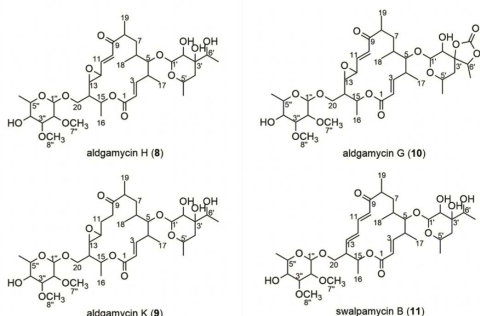


Рисунок 11. Химическая структура соединений 8–11, выделенных из культуральной жидкости *Saccharothrix* sp. 16Cb2-4.

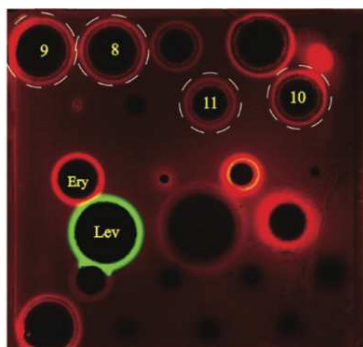


Рисунок 12. Индукция двойной репортерной системы pDualrep2 ингибиторами синтеза белка или веществами, вызывающими SOS-Ответ. Капли эритромицина (Ery), левофлоксацина (Lev) и исследуемых образцов помещали на поверхность чашки с агаризованной средой, содержащей клетки *Escherichia coli* ΔtolC, трансформированные репортерной плазмидой pDualrep2.

Тетраценомицин X

Данная часть работы была проведена группой исследователей. Автор и Тинаше Принц Мавиза работали над очисткой активного вещества, а также занимались биохимической частью работы. Автор непосредственно занимался колоночной хроматографией, измерением минимальных ингибирующих концентраций, а также выполнением части тоупринтинг анализов.

Установление структуры активной молекулы

В ходе проведения высокопроизводительного скрининга было выявлено присутствие ингибитора трансляции в культуральной жидкости *Amycolatopsis* sp. A23. Активное соединение было очищено и проанализировано с помощью масс-спектрометрии, был снят УФ-спектр и была проведена спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Совокупность полученных данных позволила сделать вывод, что активное соединение идентично Тетраценомицину X (TcmX). Ранее подобное соединение было обнаружено в штамме *Streptomyces glaucescens*.

Исследование механизма действия Тетраценомицина X

Согласно данным литературы, механизм действия тетраценомицинов должен быть обусловлен нарушением метаболизма нуклеиновых кислот аналогично антроциклиновым антибиотикам, таким, как Доксорубин. Однако в высокопроизводительном скрининге с использованием двойной репортерной системы данная молекула проявила себя в качестве ингибитора биосинтеза белка.

В дополнительном эксперименте TcmX наносили на чашки Петри с репортером вместе с известными ингибиторами трансляции: тетрациклином (Tet) и макролидом эритромицином (Ery), а также ингибиторами репликации ДНК доксорубицином (Dox) и левофлоксацином (Lev) (Рисунок 13). Нанесение TcmX вызывало красную флуоресценцию репортера, аналогичную эффекту использованных в эксперименте ингибиторов трансляции (Tet и Ery), в отличие от ДНК-повреждающих антибиотиков Dox и Lev, вызывающих зеленую флуоресценцию. Таким образом, TcmX действительно ингибирует синтез белка и не вызывает повреждения ДНК.

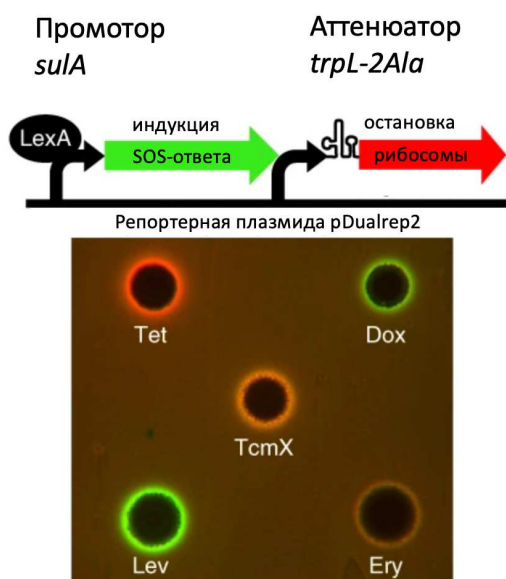


Рисунок 13. Индукция двойной репортерной системы. Нанесены Tet (0.5 мкг), Dox (2 мкг), Ery (2 мкг), Lev, (0.05 мкг) и TcmX (2 мкг).

Чтобы непосредственно оценить способность TcmX ингибировать синтез белка, также была использована бесклеточная система трансляции *in vitro* для исследования влияния повышения концентрации TcmX на экспрессию люциферазы светлячка (Fluc). Было показано, что TcmX и Tet ингибировали биосинтез белка, блокируя продукцию Fluc с полумаксимальной ингибирующей концентрацией (IC_{50}) 1,5 мкМ, тогда как Dox не оказывал эффекта даже при 40 мкМ (Рисунок 14). Следовательно, TcmX, как и Tet, является мощным ингибитором синтеза белка и, в отличие от Dox, не взаимодействует с ДНК, вызывая повреждение ДНК, как предполагалось ранее.

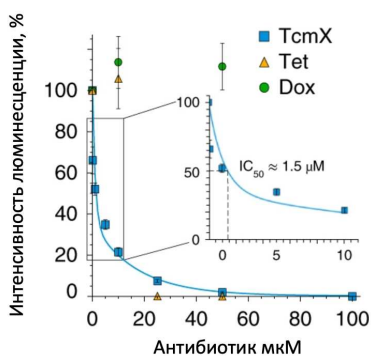


Рисунок 14. Ингибирование синтеза белка возрастающими концентрациями TcmX (голубой), Tet (желтый) and Dox (зеленый) в *in vitro* бесклеточной системе трансляции.

Мутации генов, кодирующих компоненты рибосомы, придающие устойчивость к TcmX

Чтобы установить, действует ли TcmX непосредственно на рибосомы, был проведен эксперимент по поиску и изучению устойчивых клонов.

В результате отбора устойчивых клонов было получено несколько штаммов, демонстрирующих МИК в 8–16 раз выше, чем у штамма дикого типа (Таблица 1). Повышение МИК этих штаммов было специфичным для TcmX, в то время как для Ery не наблюдалось повышения МИК. Секвенирование всего оперона рРНК устойчивых к TcmX штаммов выявило одиночные нуклеотидные замены U2586A, U2586G или U2609G в 23S рРНК.

Чтобы подтвердить, что эти положения нуклеотидов ответственны за фенотип устойчивости к TcmX, были сделаны все три возможные замены оснований в этих положениях в опероне *rrnB*, расположенном на плазмиде pAM552.

Таблица 1. МИК для различных устойчивых мутантов

Штамм <i>E. coli</i>	МИК TcmX µг/мл	МИК Ery µг/мл	Штамм <i>E. coli</i>	МИК TcmX µг/мл	МИК Ery µг/мл
BW25113	>64	>64	SQ171 ΔtolC U2586C	8	2
BW25113 ΔtolC	2	2	SQ171 ΔtolC U1782C	16	2
SQ110 ΔtolC WT	1	2	SQ171 ΔtolC U2609G	8	2
SQ110 ΔtolC U2586G	16	2	SQ171 ΔtolC U2609A	4	2
SQ110 ΔtolC U2586A	16	2	SQ171 ΔtolC U2609C	2	2
SQ110 ΔtolC U2609G	8	2	SQ171 ΔtolC A2059G	1	>64
SQ171 ΔtolC WT	1	2	SQ171 ΔtolC A2058G	1	>64
SQ171 ΔtolC U2586G	16	2	SQ171 ΔtolC U1782C/U2586C	4	2
SQ171 ΔtolC U2586A	16	2			

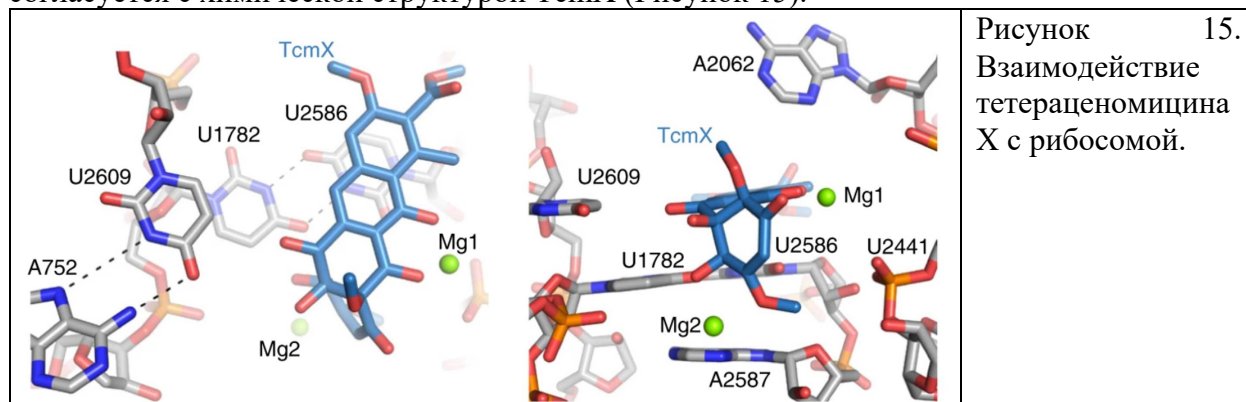
Как и ожидалось, наличие мутаций U2586G, U2586A или U2609G в опероне *rrnB* приводило к 8–16-кратному увеличению МИК, что соответствует спонтанно отобраным штаммам. Кроме того, было экспериментально показано, что мутация U2586C также приводила к восьмикратному увеличению МИК. Хотя повышенная устойчивость наблюдалась и для замен U2609A и U2609C, кратное увеличение МИК было менее значительным (в 2–4 раза).

На основании этих результатов можно сделать вывод, что TcmX взаимодействует с большой субъединицей рибосомы, в отличие от родственного антибиотика Tet сайт, связывания которого находится на малой субъединице.

Исследование механизма действия на большую субъединицу рибосом *E. coli*

Для определения сайта связывания TcmX на бактериальной рибосоме TcmX инкубировали с 70S рибосомами *E. coli* (Eco70S) и анализировали полученный комплекс с помощью крио-ЭМ. Полученная карта комплекса TcmX-Eco70S имела среднее разрешение 2,9 Å

Изучение карты крио-ЭМ выявило единственную дополнительную плотность, присутствующую в выходном туннеле полипептида большой субъединицы, которая согласуется с химической структурой TcmX (Рисунок 15).



Ингибирование трансляции на рибосомах человека

Для TcmX было показано, что увеличение его концентрации в среде ведет к полной потере жизнеспособности клеток НЕК293Т. Далее на экстрактах этих клеток было показано, что мишенью тетраценомицина X в клетках человека является рибосома.

Исследование влияния TcmX на элонгацию трансляции

Чтобы установить механизм действия TcmX во время трансляции, был проведен тоупринтинг, позволяющий отследить положение рибосомы на мРНК trpL-2A1a с использованием обратной транскрипции (Рисунок 16, А).

Реакции проводили как в отсутствие антибиотиков, так и в присутствии TcmX и контрольных антибиотиков Ery, Tet и тиостриптона (Ths). Как и ожидалось, в отсутствие антибиотика наблюдались множественные полосы, соответствующие транслирующим рибосомам, распределенным по всей открытой рамке считывания (ORF). Добавление Ths приводило к потере полос внутри ORF и появлению сильной полосы, соответствующей рибосомам, которые останавливались на стартовом кодоне AUG, но не могли перейти в фазу элонгации, как описано в литературе. Точно так же в присутствии Tet большинство рибосом также останавливаются на стартовом кодоне; тем не менее некоторая трансляция нисходящей ORF была очевидна. Напротив, в присутствии Ery большинство рибосом транслировали первые семь кодонов мРНК, но затем застревали с седьмым (Leu, L) кодоном, расположенным в Р-сайте, и восьмым кодоном (Lys, K) на А-сайте. Это согласуется со способом ингибирования макролидов, таких, как Ery, которые позволяют синтез коротких олигопептидов, но ингибируют дальнейшее удлинение формирующейся полипептидной цепи за счет закупорки рибосомного туннеля.

Результаты тоупринтинга в присутствии TcmX очень напоминают результаты, наблюдаемые для Ery, что указывает на то, что TcmX обладает сходным механизмом действия, позволяя синтезировать короткие олигопептиды перед остановкой дальнейшего удлинения полипептидной цепи.

Дополнительно был сделан тоупринтинг с использованием другой матрицы – мРНК ErmBL (Рисунок 16, В). Как отмечалось ранее, Ery индуцирует остановку трансляции ErmBL, в то время как десятый (Asp, D) кодон располагается в Р-сайте. В то время как TcmX также останавливал трансляцию на матрице ErmBL, остановка рибосомы наблюдалась не на десятом кодоне, а скорее, на 16-м (Leu, L) кодоне (Рисунок 16, В). Исходя из полученных данных, можно предположить, что аналогично макролидам остановка трансляции, опосредованная TcmX, также зависит от состава образующейся полипептидной цепи, но у TcmX специфичность последовательности не такая, как у макролидов, например, эритромицина. Следовательно, можно сделать вывод, что TcmX не ингибирует инициацию трансляции, а скорее, блокирует раннюю стадию элонгации (Рисунок 16, А, Б), аналогично механизму действия макролидов, таких, как Ery, что согласуется с положением TcmX в туннеле рибосомы (Рисунок 16, D). TcmX не перекрывается с тРНК А- или Р-сайта (Рисунок 16, Г), а располагается глубже внутри выходного туннеля, аналогично Ery (Рисунок 16, Д), где он может мешать удлинению формирующихся полипептидных цепей (Рисунок 16, Д). Хотя TcmX связывается на противоположной стороне туннеля по отношению к Ery, можно отметить, что степень блокировки туннеля не является полной и что оставшееся пространство также может позволить синтез части пептида в присутствии антибиотика (Рисунок 16, Е)

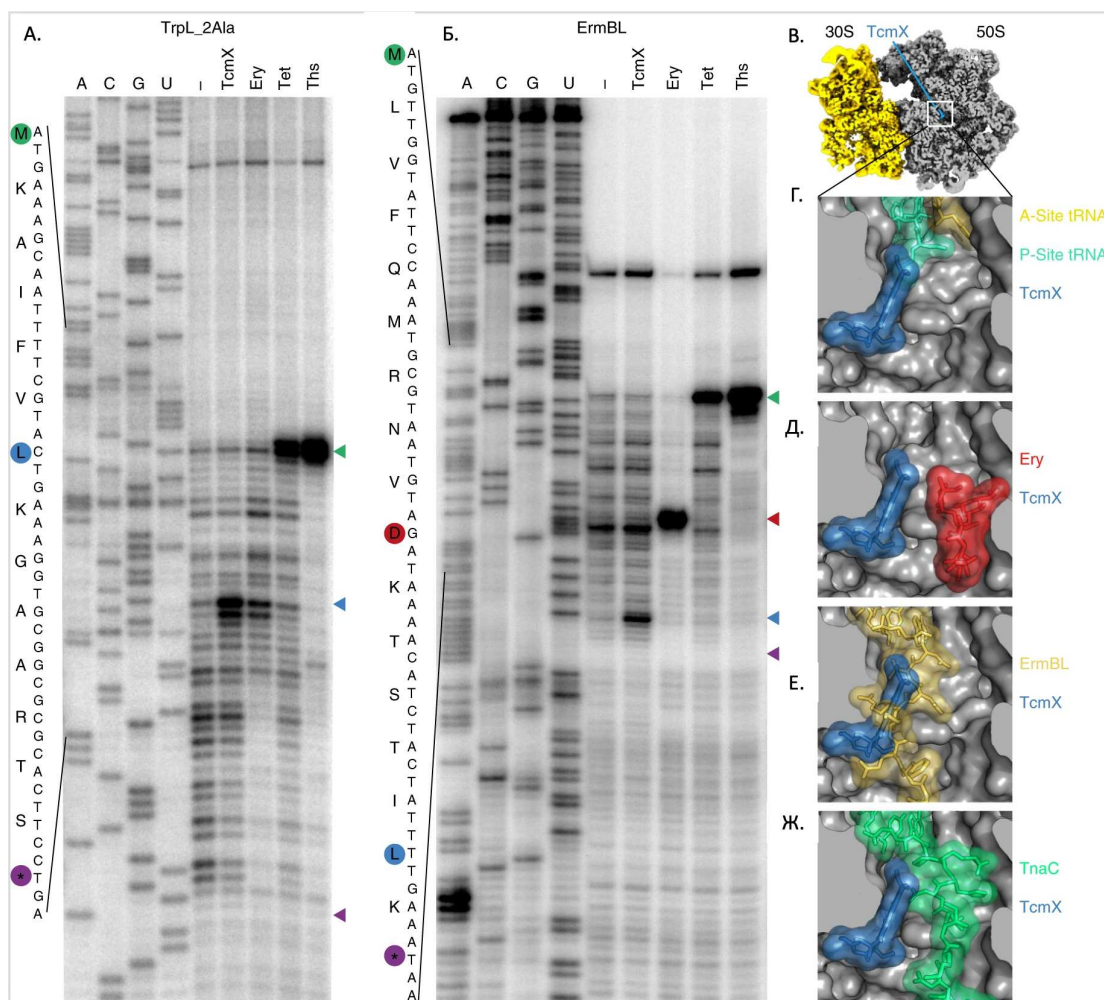


Рисунок 16. А, Б - Тоупринтинг с матрицами TrpL-2Ala (А) и ErmBL (Б) в присутствии или отсутствии TcmX и контрольных антибиотиков Ery, Tet и Ths. Ths и Tet ингибируют инициацию (зеленая стрелка), в то время как TcmX и Ery приводят к остановкам в ходе элонгации на седьмом кодоне для матрицы TrpL_2Ala (А) и на 10 и 16 кодоне для ErmBL (Б). В контроле без антибиотика трансляция продолжается до стоп-колода в конце (фиолетовая стрелка). Кодоны в Р-сайте отмечены цветными кружками; обратите внимание, что из-за большого размера рибосомы остановки обратной транскриптазы смещены на 16 нуклеотидов относительно кодона расположенного в Р-сайте. В-Ж, поперечное сечение крио-ЭМ-карты TcmX-Есо70S, показывающее сайт связывания TcmX в выходном туннеле (В), с увеличением (Г-Ж), показывающим относительное расположение TcmX (синий) по сравнению с А- сайтом Phe-тРНК (желтый) (Г) и Р-сайтом fMet-тРНК (зеленый), эритромицин (красный) (Д), зарождающаяся цепь ErmBL (золото) (Е) и зарождающаяся пептидная цепь TnaC (зеленый) (Ж) . Эксперименты были повторены дважды независимо друг от друга с аналогичными результатами.

Ранее предполагалось, что антимикробная и цитотоксическая активность тетраценомицинов является результатом способности этого семейства соединений встраиваться в ДНК и тем самым вызывать повреждение ДНК. Это предположение также подкреплялось сходством тетраценомицинов с Dox, а также сообщением о том, что тетраценомицины не ингибируют *in vitro* синтез полифенилааланина на поли(U) матрице.

Однако в рамках данной работы было показано, что (1) TcmX не вызывает SOS-ответ из-за повреждения ДНК, как это наблюдается для Dox (Рисунок 13), и (2) TcmX, в отличие от Dox, не ингибирует включение тимина в ДНК у живых организмов. Кроме того, (3) TcmX, как и Tet, ингибирует включение валина в белки, и (4) TcmX, как и Tet, ингибирует синтез белка в бактериальной системе трансляции *in vitro* (Рисунок 14), а также в лизатах

клеток человека. Более того, было экспериментально показано, что у бактерий рибосомы и синтез белка являются физиологической мишенью для TcmX. Единичные точечные мутации в 23S рРНК придают устойчивость к TcmX (Таблица 1).

Аураплагин – новый ингибитор трансляции

Установление структуры активной молекулы

Первичный поиск культуральной жидкости, проявляющей антибактериальную активность, проводился среди штаммов из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов при помощи репортерной системы pDualrep2. Активность проявила культуральная жидкость штамма *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862.

Далее была произведена очистка активного компонента. После чего для активного компонента был зарегистрирован спектр УФ-поглощения, были сняты масс-спектры высокого разрешения. Масса активного вещества составила 397 г/моль, в результате поиска по химическим базам данных вещества с такой массой обнаружено не было. Для определения структуры вещества был использован метод ЯМР, с помощью которого было идентифицировано соединение, обладающее активностью. Им является (Z)-5-бензил-3-((2E,4E,6E)-1,9-дигидрокси-8-метилдека-2,4,6-триен-1-илиден)-5-гидрокси-1-метилпирролин-2,4-дион. Соединение имеет золотисто-желтый цвет. Было принято решение назвать новое соединение аураплагин (Рисунок 17).

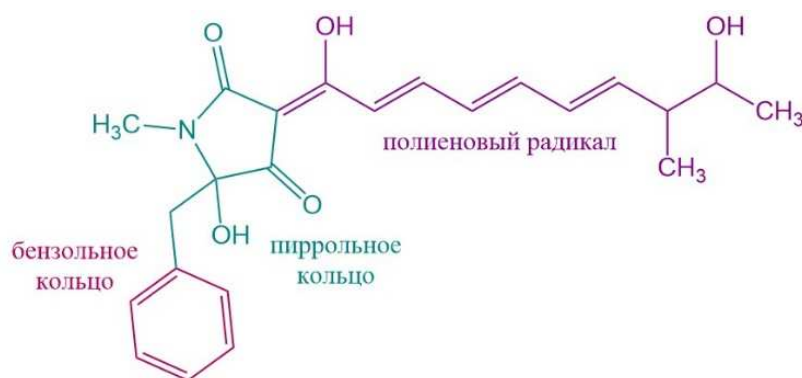


Рисунок 17. Структурная формула аураплагина с обозначенными структурными мотивами.

Трансляция в бесклеточной системе

Перед тем как перейти к *in vitro* экспериментам, было необходимо измерить минимальную ингибирующую концентрацию аураплагина. Для чистого образца антибиотика, действующего на штамм *E. coli ΔtolC KanR*, она оказалась 10 мкг/мл.

Реакцию трансляции в бесклеточной системе проводили с использованием набора PURExpress от компании NEB. Эффективность синтеза люциферазы светлячка в данном эксперименте определяли, используя реакцию окисления люциферина в оксилуциферин. Аураплагин использовали в диапазоне концентраций от 0 до 1000 мкМ. В данном эксперименте отчетливо видна концентрационная зависимость (Рисунок 18), таким образом, подтверждается предположение о том, что данная молекула является ингибитором синтеза белка в бактериях. Результаты каждого эксперимента нормировали по растворителю (диметилсульфоксиду), добавленному в том же объеме, что и раствор исследуемого вещества.

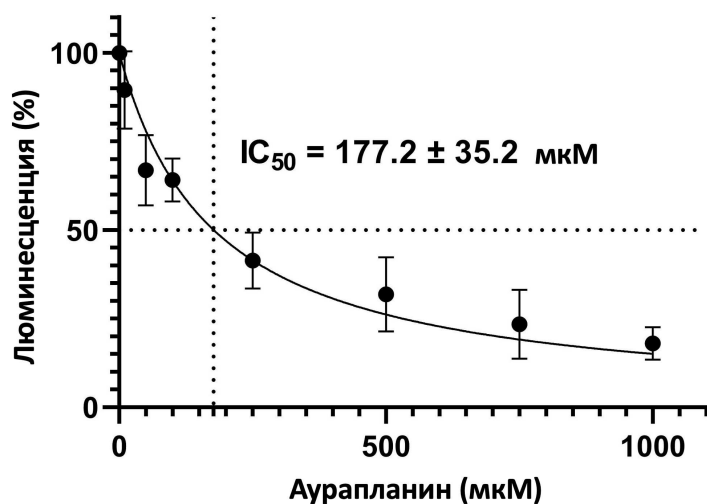


Рисунок 18. Трансляция в бесклеточной системе на основе набора *PURExpress* (NEB) с добавлением разных концентрация аурапланина. За 100% взят сигнал от люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе, без добавления ингибиторов трансляции.

Для данного соединения также была проведена проверка активности в бесклеточной эукариотической системе трансляции. Аураплагин не ингибирует трансляцию в эукариотической системе в концентрации 2,5 мМ.

Следующим этапом работы был анализ стадии трансляции, на которой происходит остановка рибосом при помощи тоупринт анализа. Первой матрицей, на который был проведен эксперимент, стала *OsmC*. На этой матрице закодирован ген осмотически-индуцируемого белка оболочки. В ходе первого эксперимента с несколькими концентрациями аурапланина четкого профиля остановок выявлено не было. В большинстве случаев наблюдались «природные» сайты рибосомной паузы, хотя можно заметить небольшое усиление сигналов на инициаторном кодоне AUG (Рисунок 19, А). При воздействии на рибосомы смесью аурапланина и либо тиостриптона (Ths), либо эритромицина (Ery). Эти антибиотики имеют характерные остановки на *OsmC* (инициаторный кодон и 3й кодон соответственно). Можно заметить появление дополнительной остановки на старте в случае смеси с эритромицином, однако полной остановки трансляции не происходит, так как в этом случае рибосомы доходят до 3го изолейцинового кодона (Рисунок 19, Б).

Далее для выяснения специфичности эффекта аурапланина был совершен переход на матрицу RST-1, имеющую по одному кодону каждой аминокислоты. Если сравнить дорожку аурапланина с контрольной (H_2O), то мы видим, что остановки усиливаются, особенно яркий эффект для пролина, а некоторые остановки исчезают при добавлении аурапланина (Рисунок 19, В).

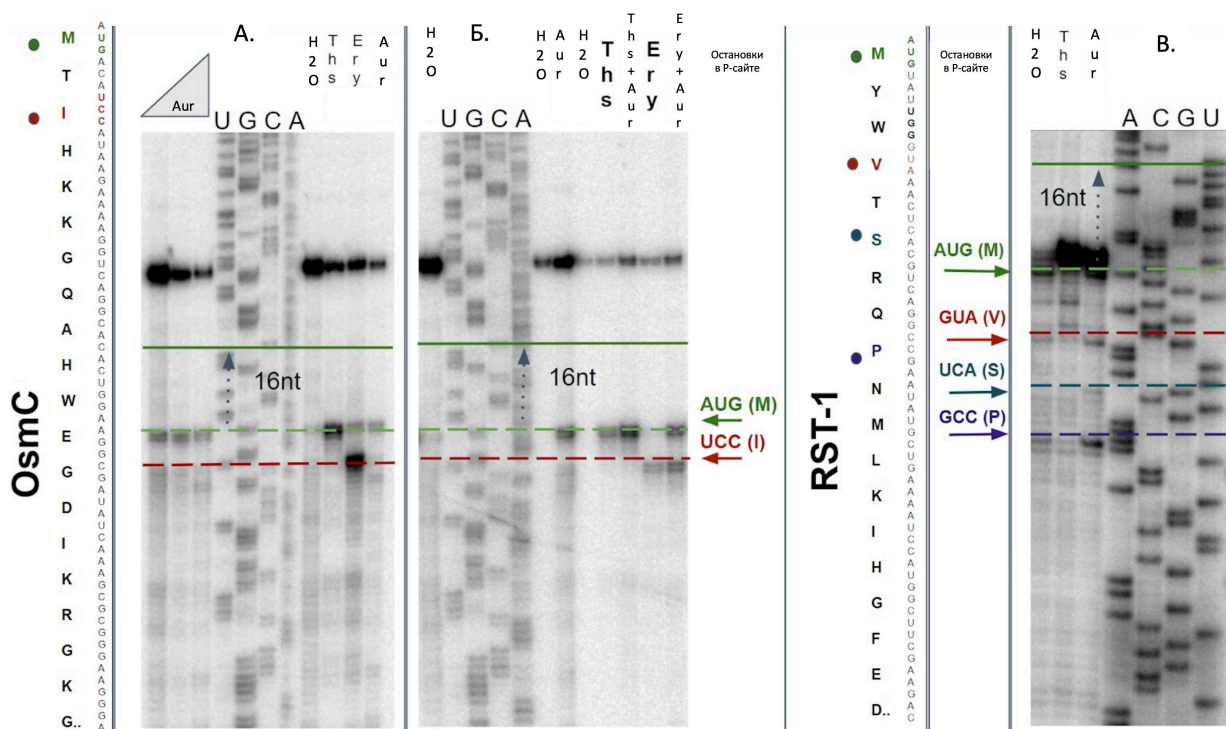


Рисунок 19. Тоупринт анализ с аурапланином на матрицах OsmC и RST-1. Слева от гелей аминокислотная и нуклеотидная последовательности соответствующих матриц. Расстояние между положением Р-сайта и его положением на карте секвенирования отличается на 16 нуклеотидов и показано серой пунктирной стрелкой. Закрашенные кружки и стрелки указывают на кодоны, на которых происходят остановки. А – тоупринт анализ на матрице OsmC с разными концентрациями аурапланина, в качестве контрольных образцов используется матрица без ингибитора H₂O, тиострептон в концентрации 50 мкМ (Ths), эритромицин в концентрации 60 мкМ (Ery), ACGU - секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах. Б - тоупринт анализ на матрице OsmC с разными комбинациями аурапланина и контрольных антибиотиков тиострептона (Ths + Aur) и эритромицина (Ery + Aur). В- тоупринт анализ на матрице RST-1 в присутствии 200 мкМ аурапланина.

В поисках наиболее яркого паттерна рибосомных остановок был проведен тест на всех доступных матрицах (ErmB, ErmC, OsmC, TrpL, RST-2, RST-1, ErmD). Матрицы ErmBL, ErmCL являются последовательностями лидерных пептидов, которые закодированы перед генами устойчивости к макролидам ermB, ermC. На этих матрицах остановки были наиболее яркие. Так как для ErmBL остановка на кодоне глутамина (Q) САА была наиболее выраженной, было принято решение посмотреть этот эффект на разных концентрациях 800, 200, 50, 25, 0 мкМ. Для концентраций 800, 200, 50 было явно заметно не менее 6 остановок, причем наиболее значимой является САА (Q). Однако при приближении к значению 25 мкМ аурапланина (это эквивалентно МИК на штамме *E. coli* ΔtolC KanR) остановка на САА почти полностью исчезает, при этом наиболее яркой становится остановка на иницирующем кодоне AUG, а стопы ниже САА немного теряют интенсивность.

Поиск устойчивых клонов

Поиск устойчивых клонов осуществлялся с помощью штамма *E. coli* SQ110 ΔtolC. Особенность этого штамма заключается в том, что в нем удалены 6 оперонов с рНК из 7. Данная модификация штамма отличается тем, что если в ходе обретения устойчивости к антибиотику изменяется последовательность ДНК, кодирующая гены рНК, то это сразу

может отобразиться на фенотипе штамма, а также это может облегчить первоначальный поиск мишени.

После отбора мутантов было осуществлено полногеномное секвенирование штаммов. На основе анализа данных, полученных в ходе секвенирования, штаммы были разделены на две группы: с мутациями в рРНК и без них. В первой группе все мутации, по-видимому, локализованы в 16S рРНК преимущественно в части, называемой петлей 560 (557-566). Эта консервативная область функционирует как шарнир, соединяющий 5' и центральный (С) домены 16S рРНК. К нашему большому удивлению, о трех (ΔA554, C564G, G566A) из четырех обнаруженных мутациях ранее не сообщалось в литературе. Что касается случая G558U, то эта мутация была выявлена в ходе скрининга и относится к группе мутантов, компенсирующих стрептомицинзависимость (Sm^D). Хотя эта мутация не была охарактеризована фенотипически, авторы отнесли ее к «ribosome ambiguity» (*ram*) или подверженному ошибкам фенотипу, анализируя структурные контакты, в которые вовлечен нуклеотид.

Кроме мутаций в 16S рРНК, 2 штамма с устойчивостью несли мутации в гене *rpsD*, приводящие к заменам I200N или Y204D в рибосомном белке S4. Точно так же два штамма *E. coli ΔtolC*, отобранные в присутствии аураплинина, содержали только одну точечную мутацию, приводящую к замене I200S в рибосомном белке S4.

Чтобы подтвердить, что выбранные изменения в 16S рРНК были единственной причиной фенотипа устойчивого к аураплинину, мы вводили каждое изменение в штамм *E. coli SQ171 ΔtolC*, который несет одну копию оперона рРНК на сменной плазмиде. Как и ожидалось, МИК для аураплинина у полученных штаммов *E. coli SQ171 ΔtolC* возросла в 16–32 по сравнению со штаммом без мутаций, тем самым подтвердив, что эти специфические изменения в 16S рРНК ответственны за фенотип AurR у выбранных штаммов. В совокупности эти результаты демонстрируют, что рибосома является мишенью аураплинина в клетке *E. coli*, и можно выдвинуть гипотезу, что аураплинин может связываться с малой субъединицей рибосомы в непосредственной близости от рибосомного белка S4 и спиралей h3 и h18 16S рРНК.

Структура комплекса антибиотика с рибосомой

Для определения сайта связывания аураплинина с рибосомой был получен комплекс антибиотика с рибосомой, и далее он был проанализирован при помощи криоэлектронной микроскопии с разрешением 2,3 Å. Рассмотрим ключевые контакты антибиотика с рибосомой.

Фенольное кольцо Aug складывается с пуриновым азотистым основанием A509, которое расположено внутри выпуклой петли внутри h18 16S рРНК (Рисунок 20, А). Чтобы проверить, является ли этот контакт существенным, мы мутировали нуклеотид A509, заменив его на три других нуклеотида в штамме, несущем один оперон рДНК на сменной плазмиде, и оценили активность аураплинина по отношению к мутантным бактериям (Рисунок 20). Замена аденина на любое из пиримидиновых оснований значительно снижала способность аураплинина ингибировать трансляцию, в то время как мутация A509G продемонстрировала более мягкое снижение ингибирования, что свидетельствует о значительном вкладе стэкинг-взаимодействия в связывание аураплинина.

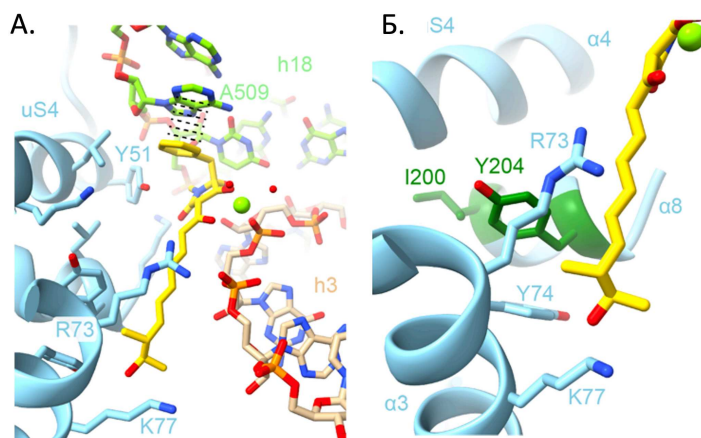


Рисунок 20. Структура аурапланина, связанного с рибосомой. А — вид кармана для связывания аурапланина. Пунктирные линии указывают на стэкинг-взаимодействие между фенольной группой аурапланина и 16S рРНК А509. Б - олефиновый «хвост» аурапланина занимает связывающий карман, образованный S4. Положение выбранных мутаций устойчивости к аурапланину показано зеленым цветом.

В совокупности структурные данные показывают, что сайт связывания аурапланина отличается от сайта любых других известных антибиотиков или небольших молекул, которые, как известно, взаимодействуют с рибосомой, что согласуется с уникальным набором мутаций устойчивости к аурапланину, о которых ранее не сообщалось для других антибиотиков, взаимодействующих с рибосомой.

Чувствительность *Ram* и *Res* мутантов к аурапланину

Стрептомицин является антибиотиком, структурно родственным семейству аминогликозидов, и так же, как аминогликозиды, вызывает ошибки в трансляции. У стрептомицина есть только один сайт связывания с рибосомой на 30S субъединице, этот сайт соединяет спирали четырех доменов 16S рРНК, а именно: h1, h18, h27 и h44, и взаимодействует с рибосомным белком S12. При выборе правильной или родственной тРНК рибосомой происходит закрытие домена 30S субъединицы, где головка и «платформа» (боковая лопасть) смыкаются на А-тРНК тРНК.

Ряд мутаций в рибосомном белке S12, дающих устойчивость к Str, а в некоторых случаях даже зависимость от него, находятся в петле рибосомного белка S12, непосредственно контактирующей с сайтом связывания Str. Из мутаций в рибосомном белке S12, дающих устойчивость к Str, только позиция Lys42 непосредственно контактирует со Str, что свидетельствует о том, что остальные мутации придают устойчивость путем изменения конформации петли S12. Кроме того, было обнаружено, что мутации в других рибосомных белках, главным образом в S4 и S5, являются компенсаторными для Str-зависимого фенотипа, содержащего мутации S12. Кроме резистентного мутанта K42R, который не изменяет точность трансляции, рибосомы, несущие мутации S12, обладают сверхточной селекцией тРНК, т. е. снижают уровень ошибок (*res*, *restrictive*). В то же время мутанты S4 или S5 склонны повышению уровня ошибок и называются мутантами рибосомальной неоднозначности (*ram*, *ribosomal ambiguity*), аналогичный эффект может проявляться при возникновении некоторых мутаций в 16S рРНК.

Исходя из полученных данных, установлено, что мутация 16S рРНК G558U, а также мутации S4 I200N и I200S, которые получились в результате отбора устойчивых к аурапланину клонов, имеют, по данным научной литературы, *ram* фенотип, то есть ведут к снижению точности трансляции. Более того, хотя вариант S4 Y204D, выделенный в ходе отбора устойчивых клонов, до этого не был охарактеризован, ранее было показано, что мутация Y204C в том же положении в S4 подавляет *res* фенотип, полученный за счет мутации устойчивости к стрептомицину K43N S12 у *Salmonella typhimurium*. Поэтому, чтобы проверить, могут ли другие известные *ram* мутации так же вызывать устойчивость к аурапланину, мы внесли *ram* мутации A160G, G299A и G347U в 16S рРНК и проверили их

влияние на МИК аураплинина Aur. Мы обнаружили, что каждая из этих *ram* мутаций приводит к 16–32-кратному увеличению устойчивости к аураплинину, несмотря на то, что они расположены далеко от сайта связывания аураплинина. Напротив, мутации С1054U и G1491A в 16S рРНК, расположенные в центре декодирования, не приводящие к ошибкам при трансляции, не влияли на восприимчивость к Aur.

Поскольку мутации *ram* могут подавлять *res* (сверхточный) фенотип мутаций устойчивости к стрептомицину, мы оценили, могут ли эти мутации влиять на чувствительность к аураплинину. Для этого мы создали штаммы *ΔtolC*, несущие хорошо охарактеризованную мутацию устойчивости к стрептомицину K43N в рибосомном белке S12, и определили МИК для аураплинина (В отличие от штаммов *ram*, *res* штамм устойчивый к стрептомицину K43N сохранял чувствительность к аураплинину даже в присутствии высоких концентраций стрептомицина, что согласуется с данными о мутации K43N, препятствующей связыванию стрептомицина. В совокупности наши результаты показывают, что *ram* мутации, которые способствуют неправильному прочтению, обычно придают устойчивость к аураплинину, тогда как ограничительные мутации, которые способствуют гиперточности, имеют тенденцию сохранять чувствительность к аураплинину.

Таблица 2). В отличие от штаммов *ram*, *res* штамм устойчивый к стрептомицину K43N сохранял чувствительность к аураплинину даже в присутствии высоких концентраций стрептомицина, что согласуется с данными о мутации K43N, препятствующей связыванию стрептомицина. В совокупности наши результаты показывают, что *ram* мутации, которые способствуют неправильному прочтению, обычно придают устойчивость к аураплинину, тогда как ограничительные мутации, которые способствуют гиперточности, имеют тенденцию сохранять чувствительность к аураплинину.

Таблица 2. Мутации в S12 рибосомном белке у штаммов устойчивых к стрептомицину.

Мутации в S12 белке wt***mut	МИК в сравнении с контролем	МИК, мкг/мл
WT <i>ΔtolC</i>	1MICwt	10
<i>ΔtolC</i> S12 K43N	0,25MICwt	2,5
<i>ΔtolC</i> S12 K43N (Str 0.5 μg/ml)	0,25MICwt	2,5
<i>ΔtolC</i> S12 K43N (Str 50 μg/ml)	5MICwt	0,5

Тест на ошибки в трансляции

Учитывая наблюдаемое взаимодействие *ram* и *res* мутаций с устойчивостью и чувствительностью к аураплинину, мы решили напрямую оценить влияние аураплинина на точность трансляции *in vivo*. Для этого мы использовали штамм *ΔtolC*, экспрессирующий репортерную плазмиду, содержащую люциферазу светлячка, несущий инактивирующую мутацию K529N (от AAA до AAU) в активном сайте, так что для восстановления требуется неправильное считывание кодона Asn529 AAU с помощью Lys-тРНКAAA/AAG, восстанавливающее активность люциферазы. Как и ожидалось, добавление стрептомицина приводило к резкому увеличению неправильного прочтения кодона, кодирующего неправильный вариант Asn529, что приводило к 68-кратному увеличению активности люциферазы по сравнению с контролем без антибиотиков (Рисунок 21, А). В то время как добавление аураплинина так же приводило к умеренному (в 3 раза) увеличению ошибочного считывания, аураплинин, по-видимому, сильно противодействовал эффекту стрептомицина, снижая уровень неправильного считывания в 10 раз, когда в анализе использовались оба соединения. Точно так же присутствие аураплинина снижало уровень

ошибок трансляции у штамма *ram* S4 I200S как в отсутствие (почти 2-кратное снижение), так и в присутствии стрептомицина (более чем 3-кратное снижение) (Рисунок 21, Б). Далее мы проверили влияние аурапламина на неправильное прочтение кодона в присутствии мутации S12 K43N, дающей устойчивость к стрептомицину. В соответствии с ранее описанным *res* фенотипом мутанта K43N мы наблюдали 4,5-кратное снижение неправильного прочтения штаммом K43N по сравнению с контролем *ΔtolC*, и было лишь умеренное (2-кратное) увеличение при добавлении стрептомицина, как и ожидалось, из-за фенотипа устойчивости к стрептомицину этого штамма. Интересно, что аурапламин, по-видимому, немного усиливал неправильное прочтение *res* штамма S12 K43N в 6,7 и 2,5 раза в отсутствие и в присутствии стрептомицина соответственно (Рисунок 21, В).

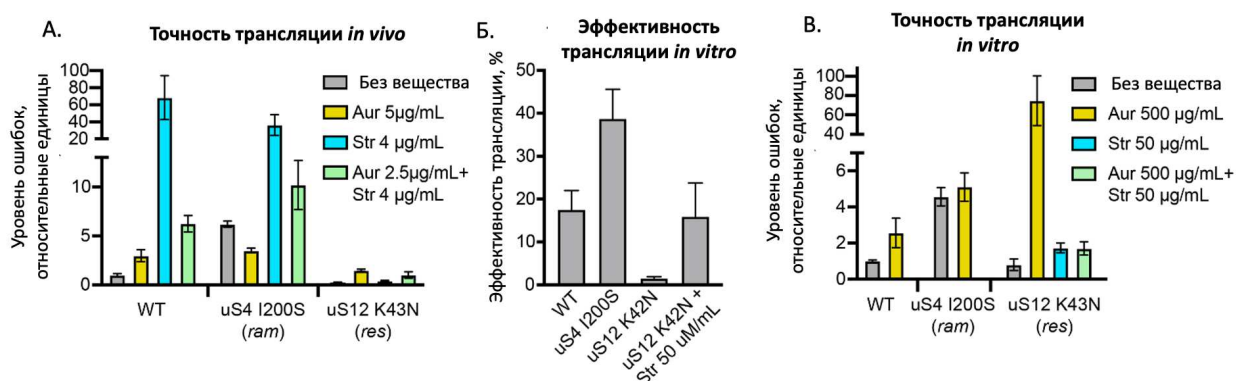


Рисунок 21. А - точность трансляции *in vivo* *ΔtolC* мутантов по белкам S4 (*ram*), S12 (*res*) в присутствии аурапламина, стрептомицина и их комбинации. Точность измерялась с помощью репортера на основе люциферазы Renilla (Rluc), используемого в качестве контроля, и люциферазы светлячка (Fluc) с инактивирующей мутацией K529N (от AAA до AAU) каталитического остатка, которая могла быть компенсирована неправильным считыванием кодона AAU с Lys-тРНК. Все результаты нормализовали по соотношению в контрольном репортере с K529 (AAA) Fluc. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности. Б - ингибирование *in vitro* и точность трансляции *ΔtolC* и мутантных рибосом S4 (*ram*), S12 (*res*) в присутствии аурапламина. Эффективность трансляции рассчитывали как отношение сигнала в присутствии и в отсутствие аурапламина. В - точность трансляции *in vitro* *ΔtolC* мутантов по белкам S4 (*ram*), S12 (*res*) в присутствии аурапламина, стрептомицина и их комбинации. Точность измерялась с помощью репортера на основе люциферазы Renilla (Rluc), используемого в качестве контроля, и люциферазы светлячка (Fluc) с инактивирующей мутацией K529N (от AAA до AAU) каталитического остатка, которая могла быть компенсирована неправильным считыванием кодона AAU с Lys-тРНК. Все результаты нормализовали по соотношению в контрольном репортере с K529 (AAA) Fluc. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Эти результаты были подтверждены и дополнены оценкой точности трансляции *in vitro*. Мутант I200S *ram* S4 демонстрирует устойчивость к аурапламину, в то время как мутант *res* S12 K43N гиперчувствителен к аурапламину, и эта гиперчувствительность подавляется стрептомицином (Рисунок 21, Б). Частичное подавление наблюдалось для рибосом, устойчивых к стрептомицину, несущих мутацию S12 K43N, что согласуется со сниженным связыванием стрептомицина с этими рибосомами.

Как и ожидалось на основании тестов *in vivo*, мы обнаружили, что аурапламин увеличивает неправильное прочтение рибосом дикого типа и *res*, несущих мутацию S12 K43N, но не склонного к ошибкам мутанта S4 I200S.

На точность трансляции влияет большое количество антибиотиков: стрептомицин, аминогликозиды, виомицин, негамицин и одилорхабины. Аминогликозиды взаимодействуют непосредственно с центром декодирования, предрасполагая его к

восприятию почти родственной aa-тРНК и ингибируя транслокацию. Стрептомицин действует на конформационное изменение рибосомы, сопровождающее процесс декодирования, замораживая конформацию, которая похожа, хотя и не идентична промежуточной закрытой конформации декодирования. Долгое время было известно, что только стрептомицин и набор мутаций *res* и *ram* сдвигают конформационное равновесие таким образом, что мутации *res* приводят к стрептомицин устойчивому или стрептомицин зависимому фенотипу, проявляющемуся тяжелой или даже полной задержкой роста без стрептомицина. Мутации *ram* были обнаружены как подавители фенотипа стрептомицин зависимости, увеличивающие частоту ошибок декодирования, несколько схожие с действием стрептомицина. Структурно мутации стрептомицин зависимости или стрептомицин чувствительности *res* обнаружены главным образом в белке S12, контактирующем с h44 при стабилизации открытой конформации малой субъединицы. В отличие от этого, *ram* мутации, обеспечивающие независимость от стрептомицина, возникающие в основном за счет мутаций в рибосомных белках S4 и S5 и в 16S рРНК, стабилизируют закрытую конформацию субъединицы. В этой работе было обнаружено, что выбранные мутации устойчивости к аурапланину в S4, такие, как I200N и I200S, и 16S рРНК, такие, как G558U, в значительной степени перекрываются с известными *ram* мутациями.

Замены в S4 и S5 – не единственные известные *ram* мутации. Существует также список подверженных ошибкам мутаций в 16S рРНК, среди которых можно выделить два класса замен: мутации, близкие к А-сайту, которые непосредственно влияют на кодон-антикодонное взаимодействие, и мутации, расположенные далеко от центра декодирования, которые создают разрыв межсубъединичного мостика В8, вызывающий дефекты при первоначальном выборе аминоксил-тРНК и корректуре. В данной работе было проверено пять известных *ram* мутаций: A160G, G299A, G347U, C1054A и G1491A. Мутации C1054A и G1491A, расположенные близко к А-участку нуклеотидов, не влияют на активность Aug, в то же время замены A160G, G299A и G347U значительно повышают устойчивость. Мутации G299A и G347U индуцируют частично закрытую конформацию даже в отсутствие тРНК А-сайта, в G347U плечо 30S субъединицы рибосомы повернуто внутрь и межсубъединичный мостик В8 разрушен, в структуре G299A плечо 30S повернуто внутрь и декодирующий нуклеотид G530 переворачивается в антиконформацию. Мутация A160G могла нарушить тройное взаимодействие между G347, C342 (оба из h14) и A160 (h8), а также разрушить мостик В8. Несмотря на схожий эффект на неправильное кодирование, эти две группы имеют разные механизмы действия: C1054A и G1491A повышают эффективность связывания почти родственных тРНК, но не влияют на стадию корректирования, G299A и G347U вызывают неправильное кодирование на обеих стадиях.

Мутации *Res* в рибосомном белке S12, которые, как известно, стабилизируют открытую конформацию 30S субъединицы рибосомы, наоборот, приводят к гиперчувствительности к аурапланину. Наконец, был продемонстрирован прямой антагонизм между стрептомицином и аураплагином *in vivo* и *in vitro*, который, предположительно, возник из-за стабилизации закрытой конформации малой субъединицы стрептомицином и открытой конформации аураплагином. Этот вывод подтверждается антагонистическим влиянием этих антибиотиков на отщепление пептидил-тРНК от А-сайта (А.Л. Коневега, неопубликованные данные). В то время как аураплагин снижает неправильное прочтение, вызванное стрептомицином и рибосомами, несущими *ram* мутации, он вызывает умеренный уровень неправильного прочтения рибосомами дикого типа и *res*, что сопровождается значительным ингибированием эффективности трансляции. Вероятным объяснением противоположных эффектов аураплагина на вероятность неправильного считывания рибосом *res*, дикого типа и *ram* является то, что различие aa-тРНК определяется соотношением между скоростями принятия родственных и почти родственных aa-тРНК. Рибосомы с *ram* фенотипом имеют повышенную скорость приема близкородственных aa-тРНК, которая снижается под действием аураплагина в большей

степени, чем прием родственных aa-тРНК. В то же время рибосомы дикого типа и *res* уже имеют низкую степень принятия близкородственной aa-тРНК, поэтому действие Aug в основном проявляется в снижении принятия родственной aa-тРНК, что приводит к общему снижению точности.

Тест на токсичность и тест на панели микроорганизмов

Для оценки возможностей потенциального применения аурапланина мы провели скрининг его активности в отношении некоторых видов микроорганизмов (Таблица 3). Аурапланин практически не проявляет активности в отношении большинства микроорганизмов за исключением штаммов *E. coli* с делецией по гену TolC, а также *Arthrobacter sp.* Однако очень интересен эффект на клинически значимый штамм *Mycobacterium tuberculosis*, МИК для которого составил 7,1 мкг/мл.

Таблица 3 Сводная Таблица МИК аурапланина для различных видов микроорганизмов. Зелёным цветом отмечены виды, МИК для которых составила менее 50 мкг/мл, жёлтым — 50-100 мкг/мл, и красным — более 100 мкг/мл.

Вид микроорганизмов	МИК, мкг/мл	Вид микроорганизмов	МИК, мкг/мл
<i>Arthrobacter sp.</i>	12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100
<i>E. coli ΔtolC KanR</i>	12	<i>Str. agalactiae</i>	100
<i>E. coli ΔtolC KanS</i>	12	<i>Str. salvarius</i>	100
<i>Lactococcus lactis</i>	100	<i>Streptococcus salvarius 497 str</i>	100
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	50	<i>Weissella confusa</i>	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7,1

После проявившейся активности на клинически значимом штамме появился вопрос о токсичности данного соединения на эукариотических клетках. Для ответа на данный вопрос был проведен МТТ-тест на клеточных линиях MCF-7, VA13, A549, Hek293T, который показал значение CC_{50} для аурапланина в диапазоне от 11 до 15, что всего в 1,5-2 раза больше минимальной ингибирующей концентрации для *Mycobacterium tuberculosis*, и, к сожалению, без модификаций, снижающих токсичность данного соединения, становится невозможным его применение в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы бы проведен масштабный поиск веществ с антибиотической активностью. Поиск производился как среди химических библиотек InterBioScreen и ChemDiv, так и среди природных источников. Преимущественно были исследованы организмы из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов. Из соединений, предоставленных химическими библиотеками, было проверено 60173 соединений, среди них был обнаружен новый ингибитор трансляции 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид. Кроме того, было проверено около 6000 природных образцов. Среди них нашлось 2 ингибитора синтеза белка. Первый – тетраценомицин X. Ранее эта молекула была описана, однако в данной работе показано, что механизм действия данной молекулы отличается от описываемого в литературе. Вторая молекула, аурапланин, является новой молекулой, не описанной ранее. В данной работе показано, что он является антагонистом стрептомицина.

В ходе работы исследован новый ингибитор бактериальной трансляции 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид, найденный в химической библиотеке. Показано, что эта молекула индуцирует репортерную систему и выступает как ингибитор трансляции *in vivo*. Установлено, что данная молекула может ингибировать трансляцию *in vitro*, а также усиливает остановку

рибосомы в ходе синтеза небольших пептидов. При этом на данном этапе эта молекула не может использоваться в качестве лекарственного средства ввиду высокой токсичности для эукариотических клеток.

В рамках данной работы было показано, что тетраценомицин X не вызывает SOS-ответ на повреждения ДНК, в отличие от структурно похожего доксорубина. Тетраценомицин X, в отличие от доксорубина, не ингибирует включение тимина в ДНК у живых организмов. Кроме того, тетраценомицин X, как и тетрациклин, ингибирует включение валина в белки, а также оба антибиотика ингибируют синтез белка *in vitro* в бесклеточной бактериальной системе синтеза белка, а также тетраценомицин X ингибирует синтез белка в лизатах клеток человека. Более того, было экспериментально показано, что у бактерий рибосомы и синтез белка являются физиологической мишенью для тетраценомицина X. Единичные точечные мутации в 23S рРНК придают устойчивость к тетраценомицину X.

В ходе работы был обнаружен новый продуцент антибиотика *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862, в культуральной жидкости которого содержится ингибитор трансляции. Далее была установлена структура активного соединения – аурапланина. Мутации устойчивости в 16S рРНК (Δ A554, G558U, C564G, G566A) и в S4 рибосомном белке (I199S/N, E201G, Y203D) ранее не были описаны в литературе. Аурапланин является антагонистом стрептомицина, он способен повышать точность трансляции, сниженную присутствием стрептомицина как на штаммах дикого типа, так и на штаммах, устойчивых к стрептомицину. Данное соединение проявило активность против клинически значимого штамма бактерий *Mycobacterium tuberculosis*, однако при этом оказалось токсичным для эукариотических клеток.

ВЫВОДЫ

1. В работе было показано, что репомоцин (1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид) является ингибитором бактериального роста, а также было продемонстрировано, что мишенью этого соединения является аппарат синтеза белка.
2. Было показано, что тетраценомицин X – ингибитор синтеза белка. Сайт связывания данного антибиотика с рибосомой находится в пептидном туннеле.
3. Был описан новый антибиотик – аурапланин ((Z)-5-бензил-3-((2E,4E,6E)-1,9-дигидрокси-8-метилдека-2,4,6-триен-1-илиден)-5-гидрокси-1-метилпирролидин-2,4-дион).
4. Было продемонстрировано, что аурапланин является ингибитором синтеза белка, имеющим новым сайт связывания с рибосомой, находящийся в так называемой петле 560.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. **Lukianov D.A.**, Buev V.S., Ivanenkov Y.A., Kartsev V.G., Skvortsov D.A., Osterman I.A., and Sergiev P.V. Imidazole derivative as a novel translation inhibitor // *Acta Naturae*. 2022. Vol. 14, №2. P. 71–77. **IF 2.07** (Web of Science), <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11654>
2. Osterman I.A., Wieland M., Maviza T.P., Lashkevich K.A., **Lukianov D.A.**, Komarova E.S., Zakalyukina Y.V., Buschauer R., Shiriaev D.I., Leyn S.A., Zlamal J.E., Biryukov M.V., Skvortsov D.A., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Cheng J., Polikanov Y.S., Bogdanov A.A., Osterman A.L., Dmitriev S.E., Beckmann R., Dontsova O.A., Wilson D.N., and Sergiev P.V. Tetracenomycin x inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel // *Nature Chemical Biology*. 2020. Vol. 16. P. 1071–1077. **IF 16.17** (Web of Science). <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0578-x>
3. Zhong-Ke J., Hu X.X., Xiao L.L., Ren Y.R., Shakhtina A.N., **Lukianov D.A.**, Osterman I.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Wang H., Wu G., You X.F., and Sun C.H. Beilunmycin, a new virginiamycins antibiotic from mangrove-derived streptomyces sp. 2bbp-j2 and the antibacterial activity by inhibiting protein translation // *Journal of Asian Natural Products Research*. 2020. P. 1–9. **IF 1.47** (Web of Science). <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1810669>
4. Wang T., Lu Q., Sun C., **Lukianov D.**, Osterman I.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Hu X., You X., Liu S., and Wu G. Hetiamacin e and f, new amicoumacin antibiotics from bacillus subtilis pjs using ms/ms-based molecular networking // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 19. P. 4446. **IF 4.97** (Web of Science). <https://doi.org/10.3390/molecules25194446>
5. Feina L., Liu S., Qinpei L., Zheng H., Osterman I.A., **Lukyanov D.A.**, Sergiev P.V., Dontsova O.A., Liu S., Jingjing Y., Huang D., and Sun C. Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable actinobacteria isolated from mangrove soil in futian and maowehai of china // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2019 P. 1–11. **IF 2.63** (Web of Science). <https://doi.org/10.1155/2019/3476567>
6. Jiang Z. K., Tuo L., Huang D. L., Osterman I. A., Tyurin A. P., Liu S. W., **Lukyanov D. A.**, Sergiev P.V., Dontsova O.A., Korshun V.A., Li N. and Sun C. H.. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in beilun estuary national nature reserve of guangxi, china // *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol.9. **IF 4.08** (Web of Science). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00868>

Иные публикации в рецензируемых научных изданиях:

1. Lisevich I., **Lukianov D.**, Razumova E., Osterman I., Sergiev P., Dontsova O. Deciphering the mechanism of action of the bacterial translational inhibitor synthesized by *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862 // *FEBS Open Bio*. 2021. **IF 2.79** (Web of Science). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13206>
2. Lisevich I., **Lukianov D.**, Wilson D., Sergiev P., Dontsova O., Osterman I. New Antibiotic Binding Site on the 30S Ribosomal Subunit // *International Journal of Biomedicine*. 2021. **IF 0.63** (Web of Science). http://dx.doi.org/10.21103/IJBM.11.Suppl_1.OR4
3. **Lukianov D.**, Lisevich I., Marina V., Wieland M., Maviza T., Razumova E., Ferberg A., Tochilkina M., Ibitoye O., Tashlitsky V., Polshakov V., Iarovenko S., Komarova K., Wilson D., Sergiev P., Dontsova O., Osterman I. Mechanism-based dual reporter screening system assists in identification of translational inhibitors // *FEBS Open Bio*. 2021. **IF 2.79** (Web of Science). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205>
4. **Lukyanov D. A.**, Komarova E. S., Shiriaev D. I., Zakalyukina Y. V., Biryukov M. V., Skvortsov D. A., Rebrikov D. D., Podlesskaia M., Khven I. M., Tashlitsky V. N., Zatsepin T. S., Serebryakova M. V., Polshakov V. I., Bogdanov A. A., Sergiev P. V., Dontsova O. A., and Osterman I. A. Tetracenomycin x novel inhibitor of translation // *FEBS Open Bio*. 2021. **IF 2.79** (Web of Science). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12453>