

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА ХИМИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

СКОЛКОВСКИЙ ИНСТИТУТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИИ  
ЦЕНТР НАУК О ЖИВОМ

На правах рукописи

Лукьянов Дмитрий Александрович

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

1.4.9 — биоорганическая химия

1.5.3 — молекулярная биология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
с.н.с., д.х.н. И.А. Остерман  
проф., член корр. РАН П.В. Сергиев

Москва 2022

# Оглавление

<b>Список сокращений.....</b>	<b>5</b>
<b>Введение.....</b>	<b>6</b>
Актуальность проблемы.....	6
Цель и задачи .....	10
Объект исследования .....	10
Предмет исследования .....	11
Научная новизна исследования .....	11
Научная и практическая значимость исследования.....	12
Методология диссертационного исследования.....	12
Основные положения, выносимые на защиту .....	13
Степень достоверности результатов .....	13
Апробация работы.....	14
Публикации.....	14
Статьи в рецензируемых научных журналах .....	15
Тезисы докладов на конференциях.....	16
Личный вклад автора .....	17
Структура и объём диссертации .....	17
<b>1. Обзор литературы .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Основные принципы трансляции.....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Инициация .....	20
1.1.2 Декодинг .....	20
1.1.3 Элонгация .....	25
1.1.4 Выходной туннель рибосомы .....	26
1.1.5 Терминация и рециркуляция .....	29
1.1.6 Рибосома как мишень антибиотиков .....	30
<b>1.2 Поиск веществ с антибактериальной активностью.....</b>	<b>34</b>
<b>1.3 Сводная характеристика веществ, структурно похожих на тетраценомицин X.....</b>	<b>45</b>
1.3.1 Поликетиды .....	45
1.3.2 Тетрациклин .....	51
1.3.3 Даунорубицин и Доксорубицин.....	55

1.3.4 Тетраценомицины.....	56
<b>1.4 Сводная характеристика веществ, продуцируемых родом <i>Actinoplanes</i> или структурно похожих на Аурапланин .....</b>	<b>65</b>
<b>2. Материалы и методы.....</b>	<b>67</b>
2.1 Используемое оборудование.....	67
2.2 Реактивы и биопрепараты .....	68
2.3 Буферы и растворы .....	69
2.4 Используемые в работе штаммы и условия культивирования .....	70
2.5 Использование двойной репортерной системы.....	71
2.5.1 Анализ механизма действия антибиотиков из химической коллекции.....	71
2.5.2 Анализ механизма действия природных образцов.....	72
2.6 Очистка действующего вещества из КЖ.....	72
2.7 Определение масс спектра действующего вещества .....	73
2.8 Определение ЯМР спектра действующего вещества .....	73
2.9 Измерение Минимальной Ингибирующей Концентрации.....	74
2.10 Тест на цитотоксичность .....	75
2.11 Трансляция в бесклеточной системе .....	75
2.11.1 Система на основе набора «E. coli S30 Extract System for Linear Templates» (Promega, США) .....	75
2.11.2 Система на основе набора PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США) ...	76
2.11.3 Система на основе набора Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease-Treated (Promega, США).....	77
2.12 Тоупринтинг анализ .....	77
<b>3. Результаты и обсуждение .....</b>	<b>81</b>
3.1 Вещества с антибактериальной активностью, найденные в химических библиотеках .....	81
3.1.1 Новый ингибитор производное имидазола .....	83
3.2 Вещества с антибактериальной активностью, найденные в природных источниках .....	90
3.2.1 Тетраценомицин X .....	97
3.2.2 Аурапланин – новый ингибитор трансляции.....	114
<b>4. Заключение .....</b>	<b>146</b>
<b>5. Благодарности .....</b>	<b>148</b>
<b>6. Список литературы .....</b>	<b>150</b>

**7. Приложение ..... 164**

## Список сокращений

Dnr – даунорубицин;

Dox – доксорубицин;

HEK - human embryonic kidney;

GFP - green fluorescent protein;

Ery – эритромицин;

LB - lysogeny broth;

NPET – выходной туннель рибосомы.

PTC – пептидил трансферазный центр рибосомы;

RFP - red fluorescent protein;

Tel – телитромицин;

TcmX, C – тетраценомицин X, C;

Tet – тетрациклин;

Ths – тиостриптон;

ВКМ - Всероссийская коллекция микроорганизмов;

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

КЖ - культуральная жидкость;

МИК - минимальная ингибирующая концентрация;

РНК – оксирибонуклеиновая;

УФ – ультрафиолет;

## Введение

### 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. Пионеры микробиологии Пастер, Кох и Эрлих неоднократно указывали на возможность существования антибиотиков [1]. В 1874 году Уильям Робертс заметил, что питательная среда, содержащая плесневый гриб *Penicillium glaucum*, не может быть контаминирована бактериями [2]. Два года спустя, в 1876 году, Джон Тиндаль сделал аналогичное наблюдение: на питательном бульоне могут расти плесневые грибы или бактерии, но очень редко они это делают одновременно [1]. Следующей важной вехой стали исследования Пауля Эрлиха, он был первым микробиологом, приложившим значительные усилия к лечению инфекционных заболеваний с использованием химических агентов. Когда П.Эрлих стал директором института Кенигличес, он сделал основной упор на поиск «специфичной химиотерапии инфекционных заболеваний» с использованием веществ, произведенных в лаборатории, а не с использованием веществ, обнаруженных в сыворотке людей или животных. Его новаторская работа в области химиотерапии выделила этот предмет в отдельную область научных исследований, однако его исследования в основном велись на животных *in vivo* [1].

Значительный прогресс в борьбе с бактериями произошел в 1920х годах, благодаря Александру Флемингу. Сначала он в 1924 году ввел новый метод тестирования с помощью кюветной пластины, метод бы впервые использован для оценки противомикробных свойств антисептических растворов [3]. После того он заметил ингибирование роста колоний стафилококка от контаминации чашки плесневым грибом, относящимся к роду *Penicillium*. И это наблюдение привело к тому, что в 1929 году, когда Александром Флемингом был открыт пенициллин [4]. Это открытие стало началом эры антибиотиков. В последующие

годы было обнаружено значительное количество новых антибиотиков, так к 1940 году было известно 6 антибиотиков, к 1960 их число увеличилось до 1740, к 1986 было известно порядка 8000 антибиотиков, а к 2000 – уже 15,8 тысяч [5].

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 развитие.

Основные классы антибактериальных препаратов ингибируют четыре классические клеточные мишени: биосинтез клеточной стенки, биосинтез белка, репликация ДНК и биосинтез кофермента фолиевой кислоты [6]. Однако одной из наиболее важных мишеней для большинства клинически значимых антибиотиков является именно аппарат для синтеза белка – рибосома [7]. Этот процесс состоит из трех этапов инициация, элонгация и терминация. Каждый из этих этапов может остановлен под действием антибиотиков.

После нахождения исследователями вещества с антибиотической активностью важной задачей является характеристика механизма действия этого вещества. Понимание этого аспекта открывает широкий простор при химической модификации вещества с антибиотической активностью что может существенно улучшить его связывание с мишенью, а также в некоторых случаях снизить токсичность для клеток человека.

Казалось бы, с таким количеством известных антибиотиков не должно быть проблем с подбором лечения, однако многие известные вещества становятся не эффективными из-за развития резистентности у бактерий. На протяжении нескольких последних лет обнаруживают все больше и больше бактерий невосприимчивых к антибиотикам. В то же время уже известные бактерии получают антибиотическую устойчивость. Все это ведет к существенному снижению эффективности используемых антибиотиков. По данным литературы, 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 [8]. Следовательно, проблема поиска новых соединений с антибиотической активностью стоит как никогда остро в наши дни. Кроме того, не менее важно понимание механизма действия соединений с антибиотической активностью.

В данной работе был применен подход по поиску веществ с антибиотической активностью при помощи репортерной системы pDualrep2. С его помощью в химической библиотеке InterBioScreen был найден новый ингибитор трансляции репомидин (1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид). Также были найдены 2 природных ингибитора трансляции. Первый тетраценомицин X, ранее он упоминался в литературе, однако только в данной работе был охарактеризован механизм его действия. Второй природный ингибитор трансляции – это новая молекула аурапланин, в данной работе была определена структура данного соединения, а также описан механизм его действия.

В ходе работы исследован новый ингибитор бактериальной трансляции 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-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 кроме того 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 ( $\Delta$ 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.

## Цель и задачи

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. Структурные исследования молекулярных основ взаимодействия антибиотика и мишени при помощи криоэлектронной микроскопии.

## 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-а]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 Репомицина, 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 репомицин. 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. Несмотря на то, что этот антибиотик был открыт более сорока лет назад [9], экспериментально механизм действия так и не был определен. В данной работе впервые было показано, что тетраценомицин X является ингибитором трансляции, а не интеркалятором ДНК, как было предположено на основании структурного сходства с другими интеркаляторами. В сотрудничестве с коллегами из лаборатории Д. Вилсона (Германия) при помощи криоэлектронной микроскопии была изучена структура комплекса антибиотик-рибосома и определен новый сайт связывания антибиотиков в пептидном туннеле.

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 стрептомцина.

## **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 60213 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 будущем может быть полезно как в 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. Репомицин (1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-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 (RICSEM), 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.

*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>

#### *Тезисы докладов на конференциях*

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](http://dx.doi.org/10.21103/IJBM.11.Suppl_1.OR4)
3. **Lukianov D.**, Lisevich I., Marina V., Wieland M., Maviza T., Rasumova 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>



### **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.

## 1. Обзор литературы

Рибосома - сложный РНК-белковый комплекс, осуществляющий процесс синтеза белка, в ходе которого генетическая информация преобразуется в аминокислотную последовательность белков. Аппарат трансляции и рибосома при этом являются одними из основных мишеней для действия антибиотиков [7, 10, 11]. Далее будут рассмотрены ключевые этапы биосинтеза белка и антибиотики на них влияющие.

### 1.1 Основные принципы трансляции

Трансляцию рибосомой генетического кода и, соответственно, синтез белка можно разделить на четыре фазы: инициация, элонгация, терминация и рециркуляция [12]. Если кратко описать весь процесс бактериальной трансляции, то перед его началом ДНК-зависимая РНК-полимераза транскрибирует ген, закодированный ДНК, в информационную РНК (мРНК), обозначая последовательность транслируемого белка. Двадцать аминокислот-тРНК-синтетаз (aaRS) и метионил-тРНК-формилтрансфераза (MTF) собирают аминокислот-тРНК, субстраты для трансляции. Три фактора инициации (IF1, IF2, IF3) помогают подготовить рибосому к трансляции генетического кода. В ходе трансляции факторы элонгации EF-Tu и EF-G тратят энергию ГТФ на синтез полипептидной цепи, перезарядка новыми трифосфатами осуществляется фактором EF-Ts. Когда трансляция белка завершена, три фактора терминации (RF1, RF2, RF3) запускают высвобождение транслируемого белка из рибосомы. Впоследствии совместное действие фактора рециркуляции рибосом (RRF) и EF-G может расщепить субъединицы и оставить рибосому в состоянии, в котором факторы инициации могут снова подготовить ее к трансляции следующей мРНК. В альтернативном пути, называемом «режим сканирования 70S», рибосома 70S может повторно иницироваться без разделения на субъединицы (Рис. 1).

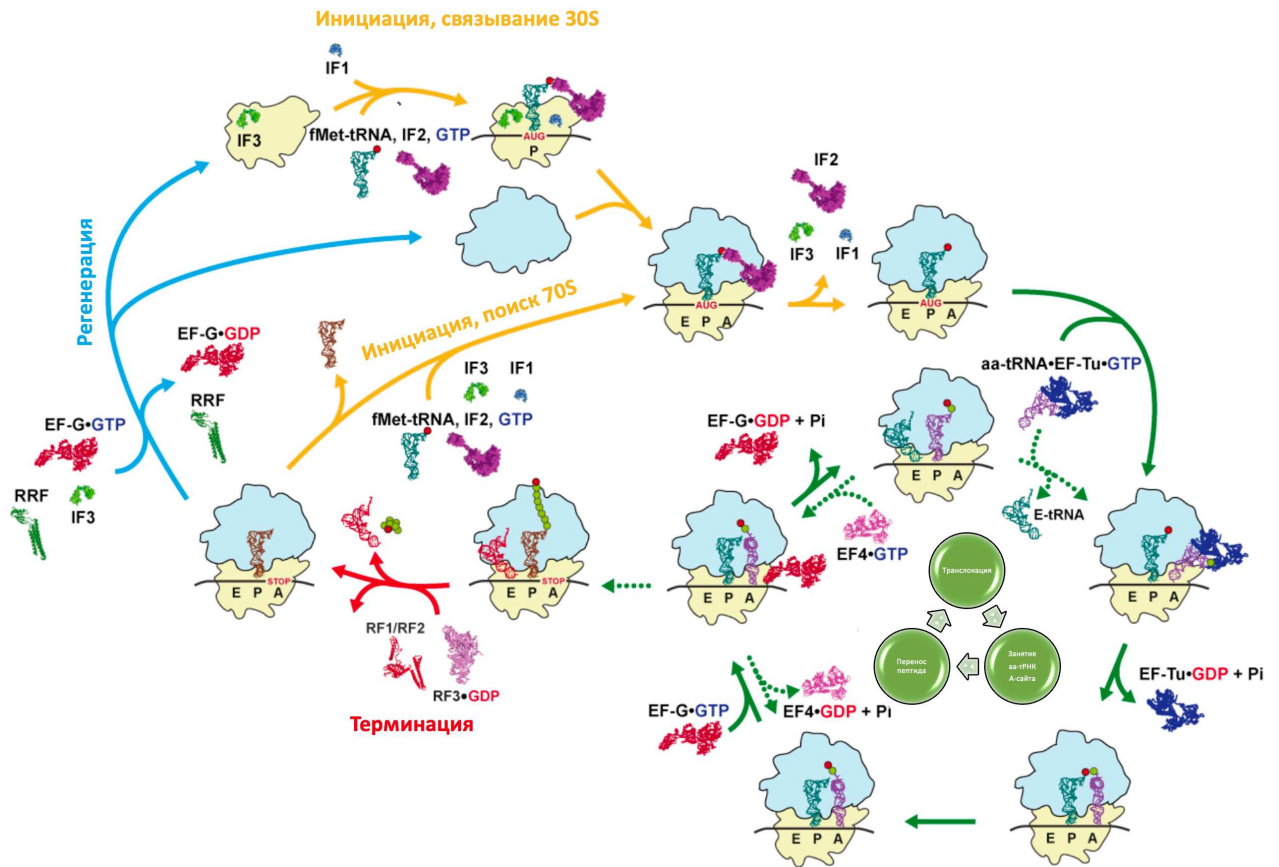


Рис. 1. Бактериальная трансляция. Инициация связывания 30S: Факторы инициации IF1, IF2 и IF3, иницирующая тРНК (fMet-тРНКfMet) и мРНК связываются с малой субъединицей рибосомы (30S). Затем присоединяется большая субъединица рибосомы, и факторы инициации диссоциируют. Элонгация: фактор элонгации EF-Tu доставляет аминоацил-тРНК к А-сайту рибосомы. Если кодон мРНК, экспонированный в А-сайте, и антикодон тРНК совпадают, тРНК размещается в А-сайте, и EF-Tu диссоциирует. Рибосома способствует образованию пептидной связи, перенося аминокислоту или пептид, присоединенный к тРНК с Р-участка, на аминокислоту, присоединенную к тРНК в А-участке, удлиняя зарождающуюся пептидную цепь на одну аминокислоту. Затем фактор элонгации EF-G способствует перемещению двух молекул тРНК, связанных с рибосомами, из А- в Р-сайт и из Р- в Е-сайт соответственно. Одновременно происходит транслокация мРНК и диссоциация EF-G. Теперь EF-Tu может доставлять следующую тРНК в А-сайт, а тРНК Е-сайта выбрасывается. В случае, если рибосома останавливается после ошибочной транслокации, EF4 может обратно транслоцировать тРНК из Р- и Е-

сайтов в А- и Р-сайты. Терминация: если стоп-кодон экспонируется в А-сайте, фактор высвобождения класса I (RF1 или RF2) высвобождает транслированный белок и впоследствии удаляется из рибосомы с помощью RF3, фактора высвобождения класса 2. Теперь рибосома может войти либо в фазу рециркуляции, либо в режим инициации сканирования 70S. Рециклинг: при совместном действии фактора рециркуляции рибосом (RRF), EF-G и IF3 рибосомные субъединицы диссоциируют, а тРНК и мРНК удаляются, тем самым подготавливая рибосому к новой инициации связывания 30S. Инициация сканирования 70S: мРНК бактерий часто являются полицистронными, кодирующими несколько генов подряд. После терминации рибосома может сканировать мРНК в поисках другого сигнала инициации вблизи стоп-кодона и повторно инициировать без диссоциации субъединицы.

### *1.1.1 Инициация*

Инициация у бактерий включает взаимодействие субъединицы 30S с последовательностью Шайна-Дальгарно на мРНК, которая комплементарна 3'-концу 16S РНК. В этом процессе также участвуют три иницирующих фактора: IF1, IF2 и IF3 [13]. Известно, что IF3 прочно связывается с субъединицей 30S и предотвращает ее ассоциацию с субъединицей 50S. Он также помогает в выборе инициаторной тРНК ( $fMet-tRNA^{fMet}$ ), дестабилизируя связывание других тРНК в Р-сайте рибосомы [14]. IF2 представляет собой ГТФазу, которая связывается преимущественно с  $fmet-tRNA^{fmet}$ , и ее сродство к рибосоме увеличивается под действием IF1 [15].

### *1.1.2 Декодирование*

Сообщается, что частота ошибок рибосомного синтеза находится в диапазоне от  $5 \times 10^{-3}$  до  $6 \times 10^{-4}$  [16]. Столь низкий уровень ошибок достигается рядом механизмов контроля, которые используют не только водородные связи и спаривание оснований Уотсона-Крика, но и контролем геометрии [17-20]. Комплементарность кодонов и антикодонов контролируется в два

последовательных этапа: первоначальный выбор и корректура, которые проиллюстрированы на Рис. 2.

Термины «почти родственный» и «неродственный» первоначально были определены на основе вероятности ошибки трансляции. Это определение связано с тем фактом, что aa-tРНК, проявляющая несовпадение с третьим основанием кодона, объясняет подавляющее большинство случаев неправильного включения. Напротив, aa-tРНК с несоответствием в первом положении редко принимают участие в удлинении пептидной цепи, а aa-tРНК с несовпадением во втором положении кодона практически никогда не участвуют [21, 22]. Следовательно, несовпадения в третьей позиции классифицируются как «почти родственные», тогда как почти все несовпадения в первой и второй классифицируются как «неродственные».

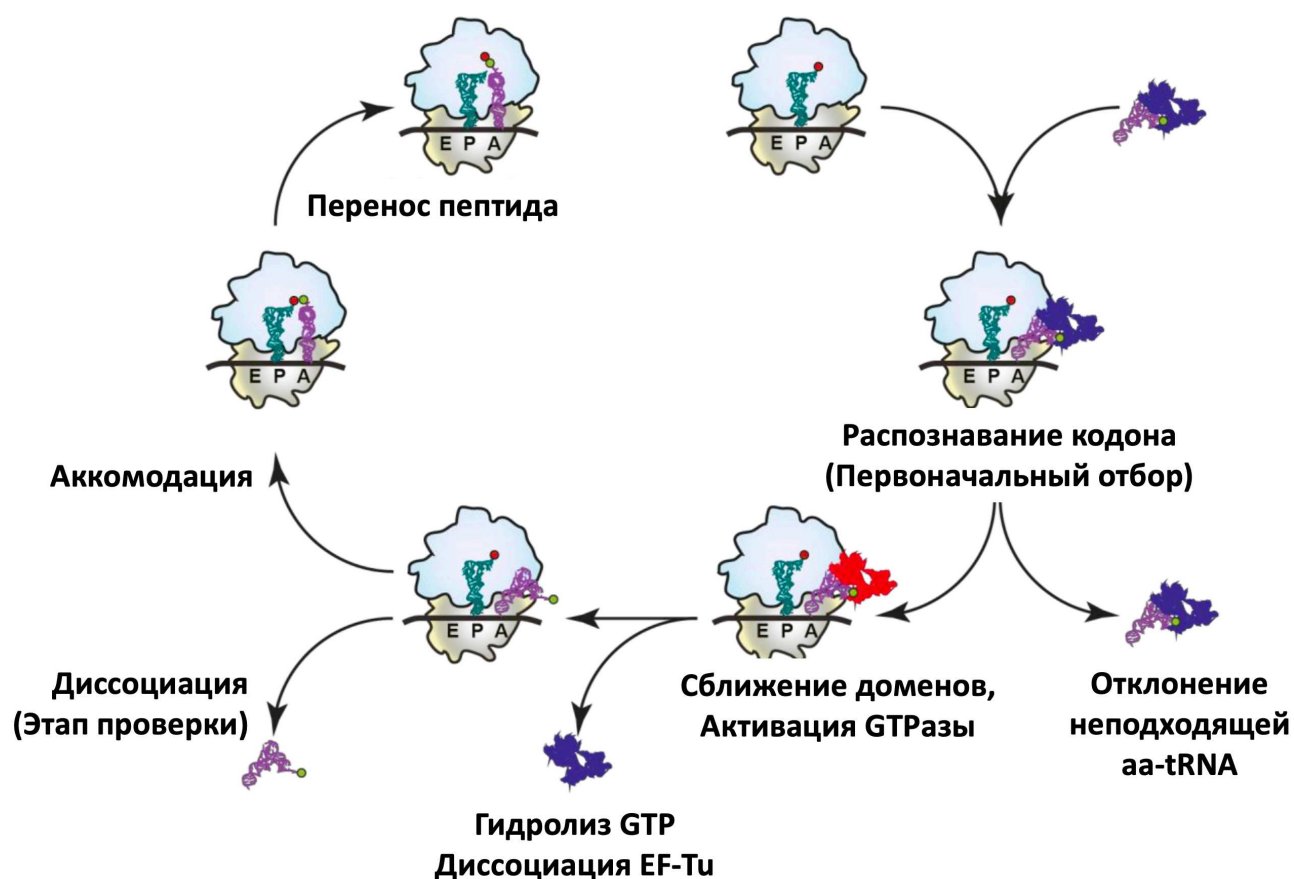


Рис. 2. Первоначальный отбор и корректура при декодировании. Тройной комплекс обратимо связывается с А-сайтом рибосомы. Скорость диссоциации неродственных и почти родственных тройных комплексов повышена, они могут

диссоциировать до гидролиза ГТФ. Функция ГТФазы EF-Tu активируется в зависимости от структурной перестройки в рибосоме, которая ускоряется при взаимодействии родственного кодона и антикодона. Когда GTP гидролизуется в результате необратимой реакции, высвобождаются EF-Tu • GDP и неорганический фосфат. Это событие разделяет первоначальный выбор и этап проверки. Теперь тРНК может полностью разместиться в А-сайте, после чего следует образование пептидной связи. Для родственных тРНК скорость аккомодации ускоряется, тогда как для почти родственных тРНК, прошедших первоначальный отбор, ускоряется скорость диссоциации.

Первым шагом в контроле точности рибосом является первоначальный отбор [23-26]. Аминоацил-тРНК представлена рибосоме в тройном комплексе с EF-Tu•GTP, который обратимо связывается с А-сайтом рибосомы [16, 27]. Уотсон-Криковская геометрия кодон-антикодоновых взаимодействий контролируется различными консервативными основаниями 16S рРНК (G530, A1492, A1493), которые могут образовывать специфические водородные связи с кодон-антикодоновой миниспиралью, если они сталкиваются с каноническим спариванием оснований в последней (Рис. 3). Им помогают два аминокислотных остатка белка uS12 (Pro44 и Ser46 в *E. coli*). Важно отметить, что эти взаимодействия не зависят от последовательности кодон-антикодоновой миниспирали, и Уотсон-Криковская геометрия требуется только для первых двух пар оснований, тогда как в третьем положении также разрешены вобл пары оснований, имеющие другую геометрию [17, 20].

В одном исследовании описали последовательность событий и энергетический ландшафт для начального шага отбора следующим образом: сначала происходит сопоставление кодона и антикодона, что является экзотермическим процессом в случае родственного кодон-антикодонового взаимодействия, и в меньшей степени в случае частично родственных кодон-антикодоновых взаимодействий. Затем нуклеотиды 16S рРНК A1492 и A1493 должны вывернуться из спирали h44, после чего они образуют А-минорные

взаимодействия с кодон-антикодоновой миниспиралью. В пустом А-сайте выключение требует больших затрат энергии ( $\Delta^\circ G \approx 7$  ккал/моль), в случае частично родственного взаимодействия все еще требует затрат энергии ( $\Delta^\circ G \approx 1$  ккал/моль), тогда как только в случае родственного взаимодействия выключение является экзотермическим и, следовательно, спонтанным ( $\Delta^\circ G \approx -2$  ккал / моль).

Последним этапом начального отбора является закрытие домена А-сайта, которое является экзотермическим с родственной тРНК в А-сайте и эндотермическим с частично родственной тРНК в А-сайте [28].

После перестройки в центре декодирования и закрытия головной и плечевой областей тРНК блокируется в А-сайте [23], скорость прямой реакции увеличивается, и запускается активность ГТФазы EF-Tu, что, в свою очередь, приводит к высвобождению тРНК в А-сайте и диссоциации EF-Tu от рибосомы [29].

В соответствии с энергетическим ландшафтом, описанным выше, ранее предполагалось, что рибосома не производит этих конформационных изменений в ответ на неродственное или почти родственное спаривание оснований, потому что некоторые взаимодействия между G530, A1492, A1493 и неродственной или почти родственной кодон-антикодоновой миниспирали не могут образоваться [17, 30]. Вместо этого скорость диссоциации неродственных и почти родственных тройных комплексов перед гидролизом ГТФ увеличивается в 1000 раз по сравнению с родственными тройными комплексами, в то время как скорость гидролиза ГТФ уменьшается в 2000 раз [25, 29, 31].

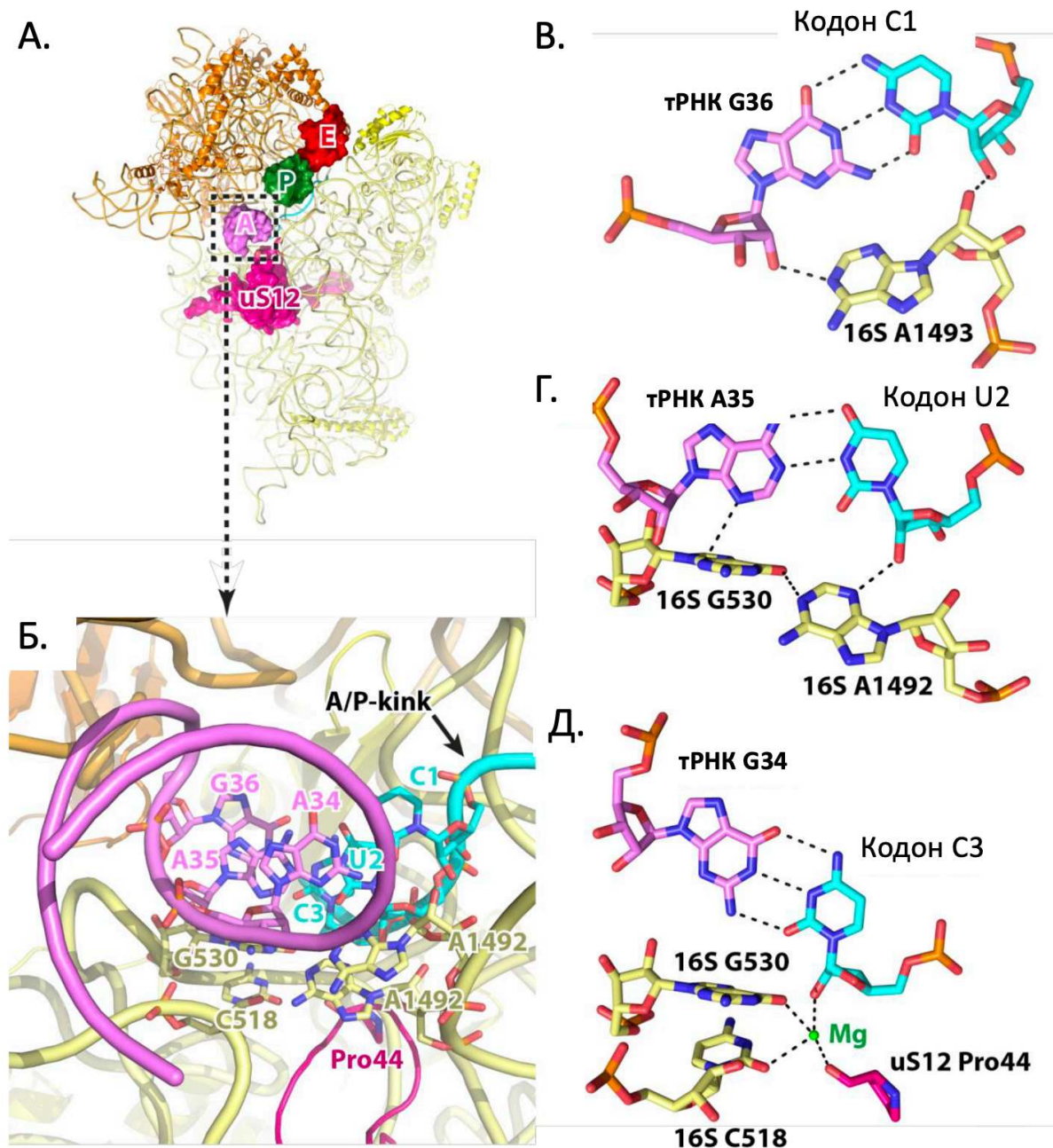


Рис. 3. Прочтение кодонов в центре декодирования. А - обзор субъединицы 30S, выделены положения S12 и створчатых петель антикодонов связанных тРНК. Тот же аспект сохраняется для других других панелей на рисунке. Б - увеличение центра декодирования, где специфический для лейцина кодон (CUC) декодируется родственным tRNA<sup>Leu</sup>. А-сайт и Р-сайт разделены перегибом в мРНК (А/Р-кинк). В - чтение первого основания кодона. Г - чтение второго основания кодона. Д - чтение третьего основания кодона. Ион магния координируется кодоном рибозы 2'-ОН, экзоциклическим О6 G530, экзоциклическим О2 C518 и карбонильным кислородом основной цепи uS12



Pro44. Примечательно, что водородные связи между tRNA<sup>Leu</sup> G34 и центром декодирования не наблюдаются.

### *1.1.3 Элонгация*

В конце процесса инициации остается аминоацилированная инициаторная тРНК в Р-сайте рибосомы и пустой А-сайт, который служит для запуска цикла элонгации. Схема цикла элонгации показана на Рис. 4. Аминоацилированная тРНК вводится в сайт А в виде тройного комплекса с EF-Tu и GTP. Правильные кодон-антикодоновые взаимодействия приводят к конформационным изменениям в рибосоме, которые стабилизируют связывание тРНК и запускают гидролиз GTP под действием EF-Tu. Это приводит к высвобождению аминоацильного конца тРНК А-сайта с помощью EF-Tu; затем тРНК перемещается в сайт пептидилтрансферазы 50S-субъединицы в процессе, называемом аккомодацией. Образование пептидной связи, которое включает деацилирование тРНК в Р-сайте и перенос пептидной цепи на тРНК в А-сайте, в этом случае происходит, по существу, спонтанно. После переноса пептида рибосома имеет деацилированную тРНК в Р-сайте и пептидил-тРНК в А-сайте. Транслокации тРНК и мРНК способствует EF-G, который также является ГТФазой. В результате получается рибосома, готовая к следующему раунду элонгации, с деацилированной тРНК в Е-сайте, пептидил-тРНК в Р-сайте и пустым А-сайтом, который готов принять следующий родственный тройной комплекс.

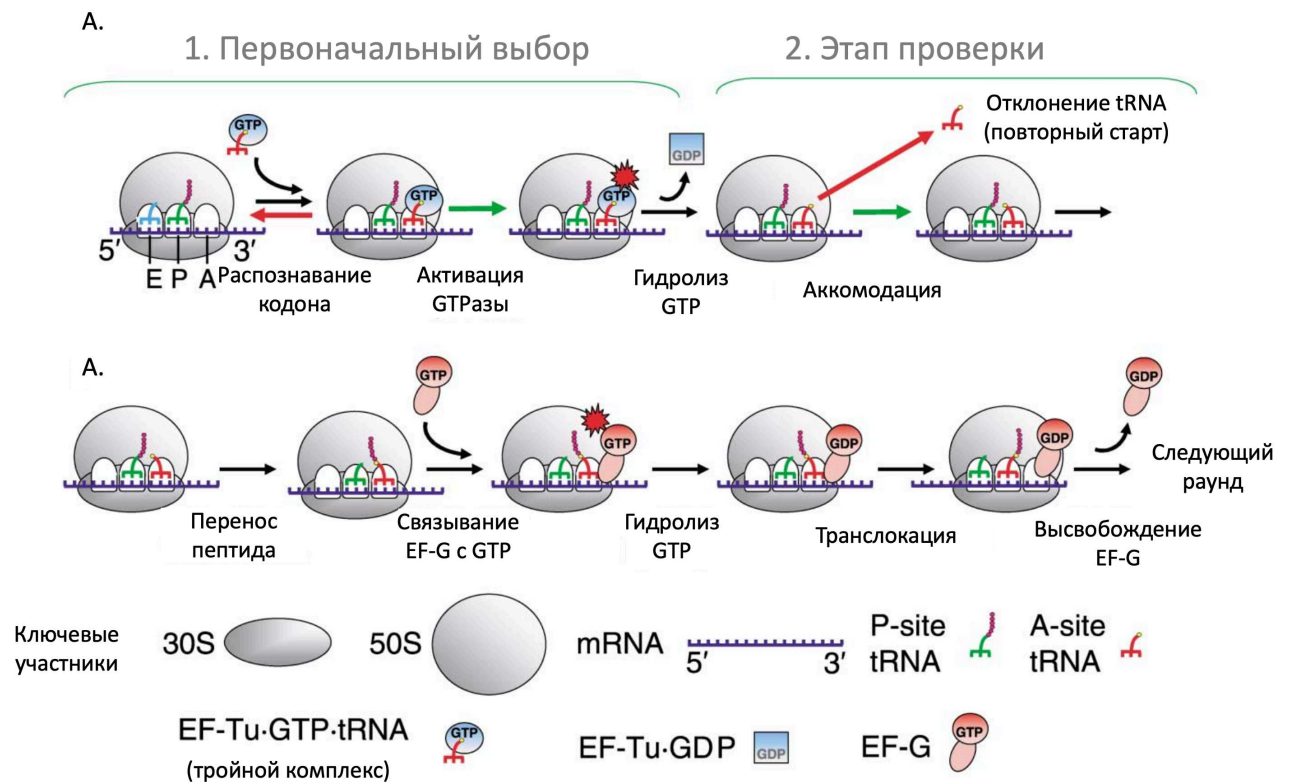


Рис. 4. Элонгация трансляции [12].

#### 1.1.4 Выходной туннель рибосомы

Новосинтезированные белки, образующиеся в пептидилтрансферазном центре рибосомы (ПТС), выходят через рибосомный туннель (NPET). NPET имеет длину 100 Å и ширину 10-20 Å, NPET начинается в пептидилтрансферазном центре рибосомы и проходит через всю большую субъединицу рибосомы [32-35].

Туннель, однако, не является беспристрастным каналом. Некоторые зарождающиеся пептиды могут специфически взаимодействовать с NPET, изменяя скорость трансляции, что в некоторых случаях может приводить к остановке трансляции. Клетка использует эти особенности взаимодействия пептидов и NPET для оптимизации регуляции экспрессии генов [36]. Распознавание отдельного возникающего пептида в NPET и рибосомный ответ могут быть индикаторами различных клеточных сигналов, таких как концентрация специфических малых метаболитов. Так, например, происходит регуляция гена *tnaC* стимулируется [37].

NPET рибосомы является местом действия клинически важных макролидных антибиотиков [38] (Рис. 5, А). Примером такого антибиотика является эритромицин (Ery), он проявляет сильную бактериостатическую активность в отношении широкого круга грамположительных и некоторых грамотрицательных патогенов [39]. Макролиды второго поколения (например, азитромицин) демонстрируют улучшенную химическую стабильность и превосходный спектр действия. Макролиды новейшего поколения, известные как кетолиды (например, телитромицин (Tel); Рис. 5, Б), еще более эффективны: они ингибируют бактерии при более низких концентрациях препарата и, кроме того, проявляют повышенную бактерицидную активность в отношении некоторых патогенов [40].

Обработка чувствительных к макролидам бактерий этими веществами снижает синтез белка и приводит к накоплению пептидил-трансферных тРНК (пептидил-тРНК) [41, 42]. Кроме того, эритромицин также эффективно ингибирует трансляцию в бесклеточной системе трансляции, проверка велась как на некоторых синтетических, так и на природных веществах [43]. Присутствие эритромицина в бесклеточной системе приводит к появлению пептидил-тРНК, несущих короткие (длиной 4–10 аминокислот) пептиды [44].

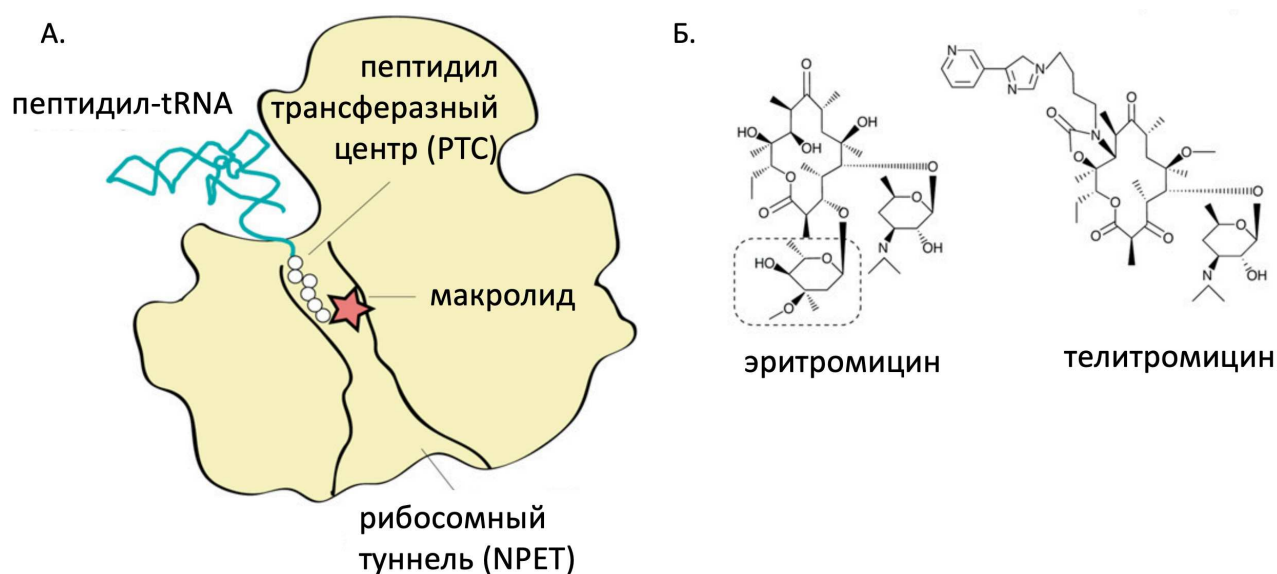


Рис. 5. Сайт связывания макролидов с большой субъединицей рибосомы. А – Связывание макролидов в NPET препятствует выходу через рибосомный

туннель новообразованного пептида. Б – Химические структуры ERY и TEL. Сахар кладиноза обведен пунктиром.

Идентификация сайта связывания макролидов с рибосомой позволило объяснить описанные выше наблюдения [45, 46]. Макролиды связываются с NPET рядом с PTC [47]. Связавшийся антибиотик резко сужает туннель, тем самым препятствуя продвижению новосинтезированного пептида. Поэтому обычно считается, что трансляция прерывается, когда зарождающийся пептид, продвигающийся через NPET, достигает места связывания антибиотика. Представление о том, что молекула макролида и удлиненная зарождающаяся цепь не могут сосуществовать в NPET, дополнительно подтверждается неспособностью Ery о связываться с рибосомами, несущими длинные зарождающиеся пептиды [48]. Таким образом была предложена модель «пробки в бутылке» из которой следовало, что все макролиды останавливают синтез любых полипептидов и целиком останавливают трансляцию. Однако данная модель не объясняла некоторых экспериментальных данных, например, ингибирование трансляции некоторых последовательностей происходило более эффективно [43]. Некоторые короткие пептиды вытесняли макролиды из рибосомы [49]. Кроме того, эта модель не объясняет, почему некоторые кетолиды проявляют улучшенную бактерицидную активность в отношении некоторых патогенов [50]. Далее в работе, сделанной группой Манькина было показано, что макролиды являются специфическими для белков, а не общими ингибиторами трансляции, потому что некоторые белки могут избежать действия макролидов, проникая через рибосомный туннель, заблокированный антибиотиком. Так же было показано, что макролиды могут останавливать трансляцию некоторых белков на более поздних стадиях синтеза полипептидов, блокируя длинные формирующиеся пептиды в NPET [51].

Рибосомный туннель является важной структурой и нередко является мишенью антибиотиков.

### 1.1.5 Терминация и рециркуляция

Процесс терминации начинается, когда стоп-кодон мРНК встречается в А-сайте (Рис. 6). У бактерий распознавание стоп-кодона включает два фактора высвобождения «класса I», RF1 и RF2 [52]. Оба фактора распознают UAA; однако UAG распознается RF1, а UGA распознается RF2. Фактор высвобождения «класса II», RF3, связывается с комплексом RF1/2 с рибосомой и представляет собой ГТФазу.

Связывание RF1/2 с рибосомой с соответствующим стоп-кодоном в А-сайте запускает гидролиз и высвобождение пептидной цепи из тРНК в Р-сайте.

Генетические эксперименты показывают, что замена консервативного трипептида между RF1 и RF2 также может менять специфичность их стоп-кодонов [53], указывая на то, что трипептид имитирует антикодон в тРНК, считалось, что этот трипептид находится на конце антикодонового домена RF1/2.

После высвобождения пептидной цепи на рибосоме остается мРНК и деацилированная тРНК в Р-сайте (Рис. 6). Этот комплекс необходимо разобрать, чтобы подготовить рибосому к новому раунду синтеза белка. Для этого процесса необходим еще один фактор, называемый фактором рециркуляции рибосом (RRF), наряду с EF-G. Одно из исследований показывает, что RRF и EF-G приводят к диссоциации рибосом на субъединицы при гидролизе ГТФ [54]. Затем для удаления деацилированной тРНК из 30S субъединицы требуется фактор инициации IF3. Однако недавно Каји и др. показали, что гидролиз GTP в комплексе рибосома-RRF-EF-G приводит к диссоциации интактной 70S рибосомы от мРНК и тРНК [55].

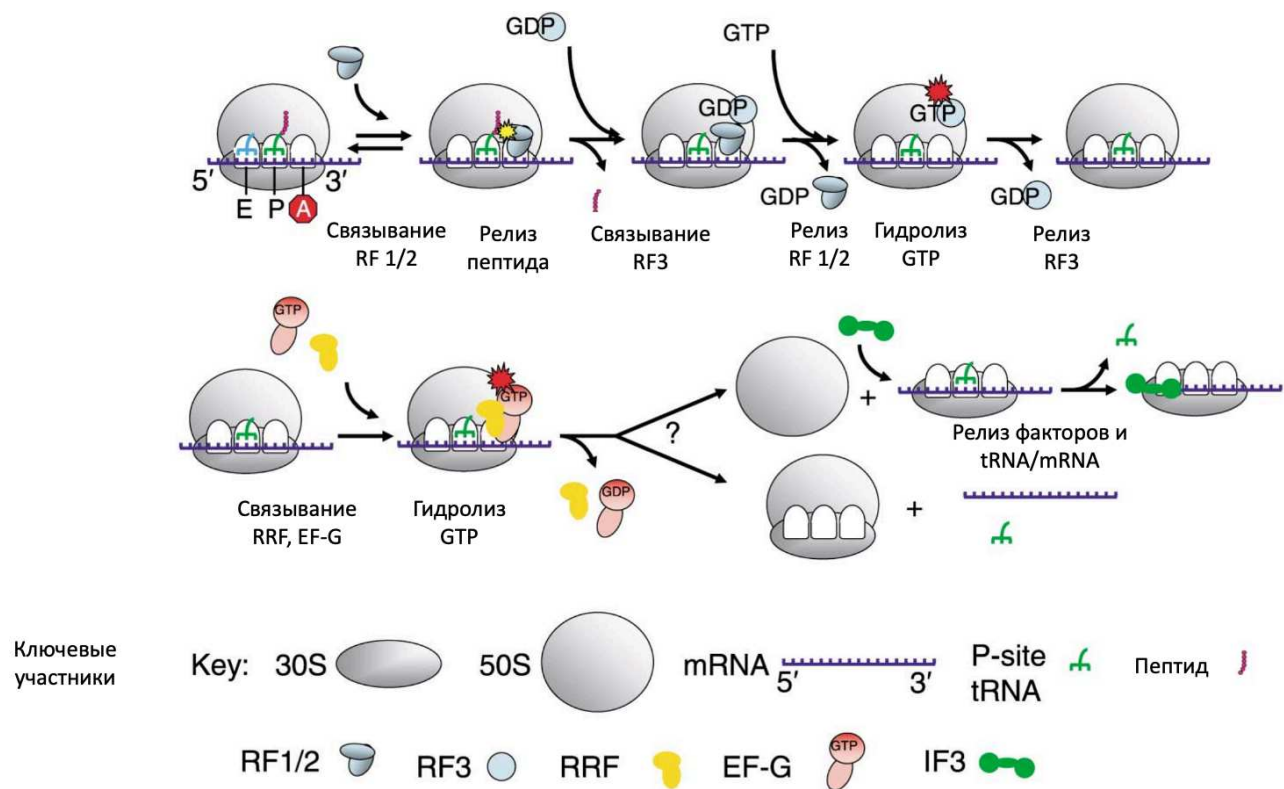


Рис. 6. Терминация трансляции.

### 1.1.6 Рибосома как мишень антибиотиков

Синтез белка состоит из трех ключевых этапов: инициация, элонгация, терминация и ресайклинг. Эти этапы были подробнее рассмотрены выше. Каждый из этих этапов может стать мишенью антибиотиков (Рис. 7), далее это будет рассмотрено немного подробнее.

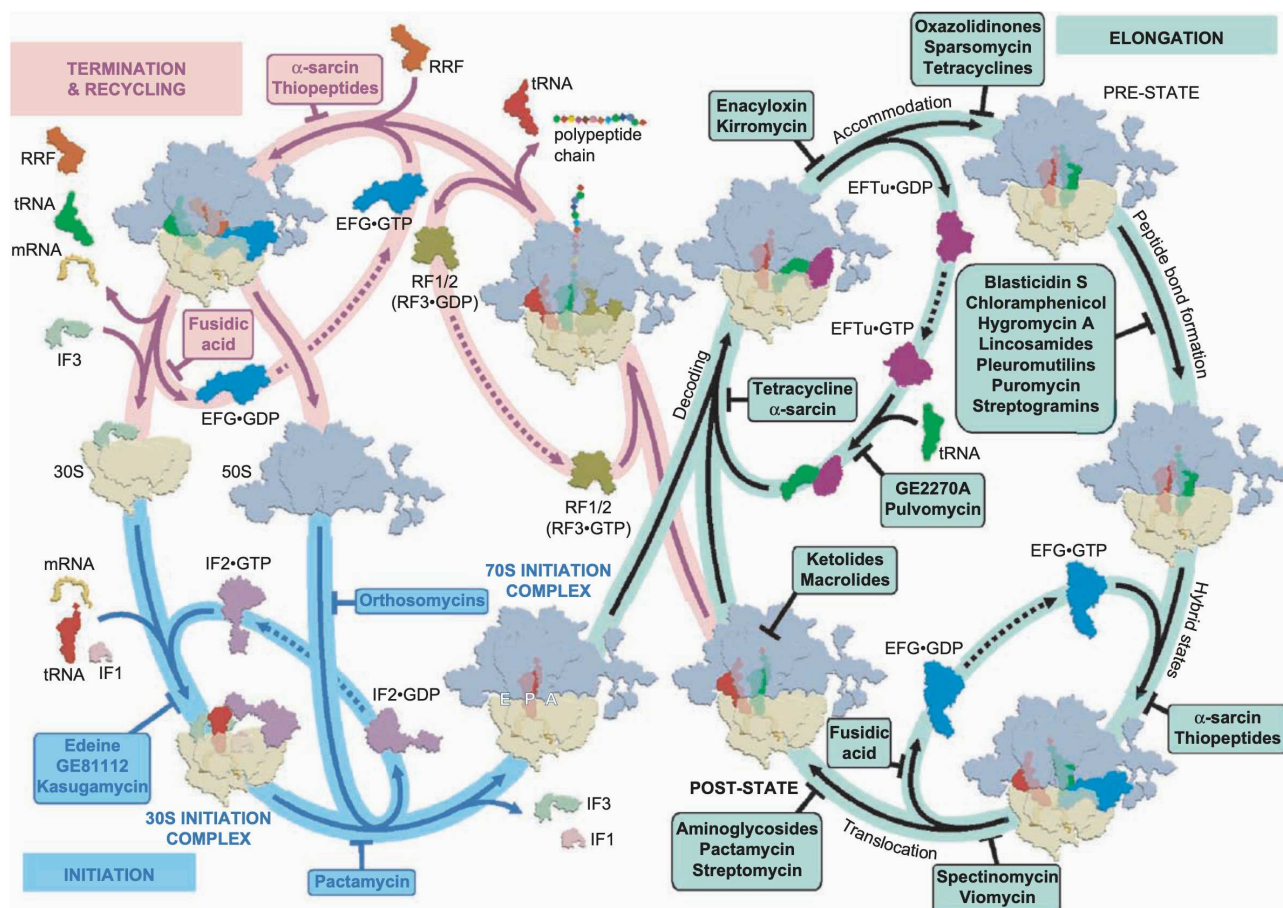


Рис. 7. Места действия антибиотиков в ходе синтеза белка. На схеме отображены места действия разных антибиотиков, влияющих на этапы синтеза белка [11].

Как показано на Рис. 7, синтез белка является целью большого количества антибиотиков. Были идентифицированы антибиотики, ингибирующие почти каждый этап трансляции. Фактически, были выявлены антибиотики, которые подавляют практически каждый этап трансляции, хотя и с различной степенью специфичности [5, 10, 56].

На рубеже веков появились первые кристаллические структуры антибиотиков, связанные с малой [57, 58] и большой субъединицей [59]. С тех пор большинство классов антибиотиков, нацеленных на рибосомы, были визуализированы в комплексе с рибосомой. Эти структуры показали, что антибиотики преимущественно нацелены на функциональные центры рибосомы, а именно связывание тРНК-мРНК на малой субъединице, пептидилтрансферазный центр (ПТС) и прилегающий выходной туннель (NPET)

на большой субъединице. Однако есть исключения, такие как ортосомицины (эвернимицин и авиламицин) и тиопептиды (тиострептон и микрококцин), которые связываются с отдельными участками большой субъединицы и препятствуют связыванию фактора трансляции. Как правило, антибиотики, нацеленные на рибосомы, взаимодействуют преимущественно, если не исключительно, с рибосомной РНК (рРНК), что отражает тот факт, что функциональные центры рибосомы богаты РНК. Исключения составляют тиопептиды, стрептомицины и спектиномицины, где рибосомные белки (r-белки) L11, S12 и S5 вносят свой вклад в соответствующие сайты связывания [11].

Из-за важности этих функциональных центров для синтеза белка, рибосомные фрагменты, являющиеся сайтами связывания антибиотиков, обычно высоко консервативны между бактериями, археями и эукариотами. Это объясняет, как некоторые соединения, такие как эдеин и спарсомицин, могут действовать как универсальные ингибиторы трансляции. Однако большинство антибиотиков, являются либо бактериальными, либо прокариотическими ингибиторами, что поднимает вопрос о том, как достигается специфичность царства [11]. В некоторых случаях антибиотики на самом деле связываются с рибосомами и подавляют трансляцию *in vitro*, но не активны *in vivo*. На это влияют такие аспекты, как плохое проникновение в клетки. Хотя эффлюкс является одним из основных механизмов резистентности, используемых бактериями, известно множество других механизмов, начиная от инактивации антибиотиков путем модификации, деградации или формирования дуплекса, до модификации мишеней [7, 60, 61]. Тем не менее, с точки зрения рибосомы, специфичность мишени, по-видимому, определяется окружением сайта связывания антибиотика. Этот внешний слой менее консервативных компонентов может также способствовать видоспецифичности действия антибиотиков.

Большинство антибиотиков, которые поражают рибосому, являются бактериостатическими, что означает, что они подавляют рост, но не убивают



бактерии [62]. Единственным исключением является семейство аминогликозидов, которое вызывает смерть клеток и поэтому считается бактерицидным классом антибиотиков [63]. Следует отметить, однако, что некоторые бактериостатические антибиотики проявляют бактерицидную активность, когда используются при высоких концентрациях в течение длительных периодов времени [64]. Тем не менее, аминогликозиды вызывают гибель клеток при значительно более низких концентрациях и времени инкубации, чем другие ингибиторы трансляции [64]. Бактерицидный эффект аминогликозидов, как полагают, является результатом неправильного чтения и неправильного сложения мембранных белков, что приводит к окислительному стрессу и гибели клеток [65]. Это несколько удивительно, поскольку бактериальные штаммы жизнеспособны при мутациях в рибосомных белках S4 и S5, вызывающие сравнительный с аминогликозидами уровень ошибок при встраивании аминокислоты [66].

Кроме того, было высказано предположение, что дефекты сборки являются вторичными эффектами, которые являются результатом ингибирования трансляции вместо прямого воздействия на сборку рибосомы [67, 68]. Аргументов в пользу этого послужило то, что при ингибировании трансляции предотвращается образование рибосомных белков, в то время как транскрипция продолжается, что приводит к повышению концентрации рРНК над рибосомными белками. Этот нефизиологический дисбаланс между рРНК и р-белками был предположен, чтобы объяснить наблюдаемые дефекты в рибосомной сборке, по крайней мере это наблюдается в присутствии антибиотиков эритромицина и хлорамфеникола [68].

Несмотря на то, что уже известны ингибиторы почти всех этапов синтеза белка, дальнейшее исследование механизмов действия трансляционных ингибиторов может добавить детали и уточнить некоторые этапы работы рибосомы, что может послужить большим подспорьем для модификации существующих препаратов

## 1.2 Поиск веществ с антибактериальной активностью.

Есть два основных подхода к поиску новых веществ, обладающих антибактериальной активностью. Первый подход — это тест в жидкой среде посредством добавления тестируемого соединения к культуре клеток тест-штамма. В данном случае есть возможность одновременно проверять 96, 384 и даже 1536 образцов. Однако у такого подхода есть недостаток: заранее сложно предсказать диапазон концентраций, при которых получится детектировать активность, и требуется проверка сразу нескольких разбавлений, однако при таком подходе легко масштабировать проверку и несложно осуществить автоматизацию. Другой подход – тест веществ методом диффузии образцов в агаре. Этот метод был разработан еще в первой половине прошлого века [69]. Однако, оба подхода не позволяют каким-либо образом предположить механизм действия веществ с антибактериальной активностью.

Для поиска веществ, обладающих антибактериальной активностью, в нашей лаборатории была разработана репортерная система pDualrep2 [70], закодированная на плазмиде. Данная репортерная система позволяет выявить антибиотики, приводящие к нарушению трансляции, а также антибиотики, вызывающие SOS-ответ.

Репортерная система основана на механизмах регуляции клеточного метаболизма. В основе работы первой части репортерной системы лежит такой консервативный процесс регуляции экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм как аттенуация [71]. В частности, аттенуация триптофанового оперона в клетках *E.coli* [72]. Гены, кодирующие ферменты необходимые для синтеза триптофана находятся после гена, кодирующего регуляторный пептид trpL. Данный пептид содержит тандем триптофановых кодонов, которые могут создавать триптофанил-тРНК-зависимый сайт рибосомной паузы [73]. Если причиной паузы стало голодание клетки по триптофану, то транслирующая рибосома влияет на вторичную структуру транскрипта и ведет к образованию шпильки «2-3» (Рис. 8, А), предотвращая преждевременную терминацию транскрипции через р-независимый терминатор. Если же в клетке концентрация

триптофана достаточно для того, чтобы рибосома прошла без остановок участок с тандемом триптофановых кодонов, то в таком случае образуется шпилька «3-4» ведущая к терминации транскрипции (Рис. 8, Б).

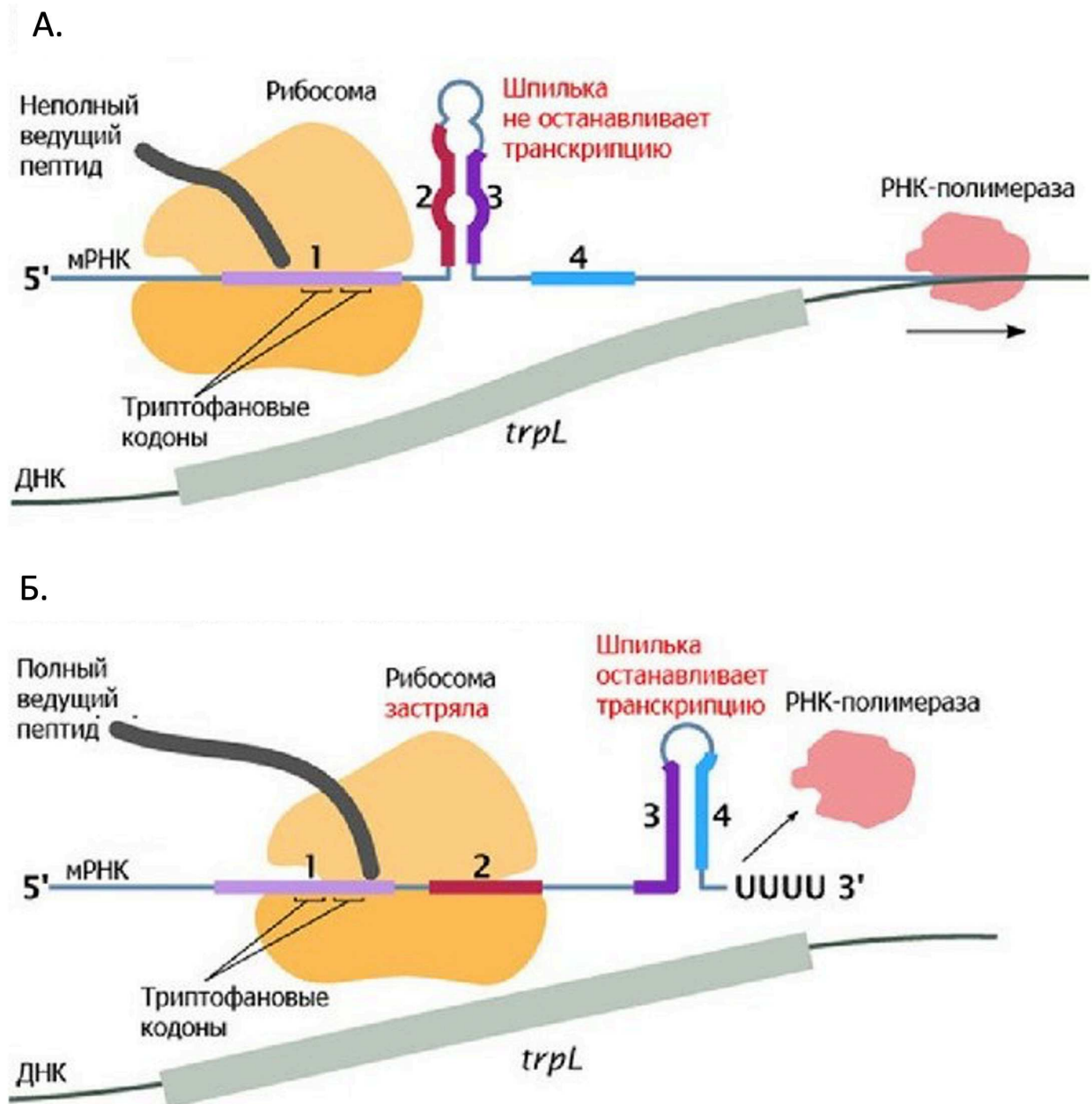


Рис. 8. Принцип действия триптофанового аттенюатора. А – низкий уровень триптофана, Б – высокий уровень триптофана.

В репортерной системе аттенюаторная последовательность, кодирующая лидерный пептид *trpL*, была модифицирована. Редкие триптофановые кодоны были заменены на аланиновые (W10 и W11 на А), не вызывающие паузу в

трансляции в нормальных условиях. Перед лидерным пептидом закодирован конститутивный промотор T5, а после него закодирован флуоресцентный белок KATUSHKA2S. Таким образом если в ходе синтеза лидерного пептида рибосома останавливается, то это означает что в среде присутствует ингибитор трансляции, препятствующий работе рибосомы (Рис. 9, А)

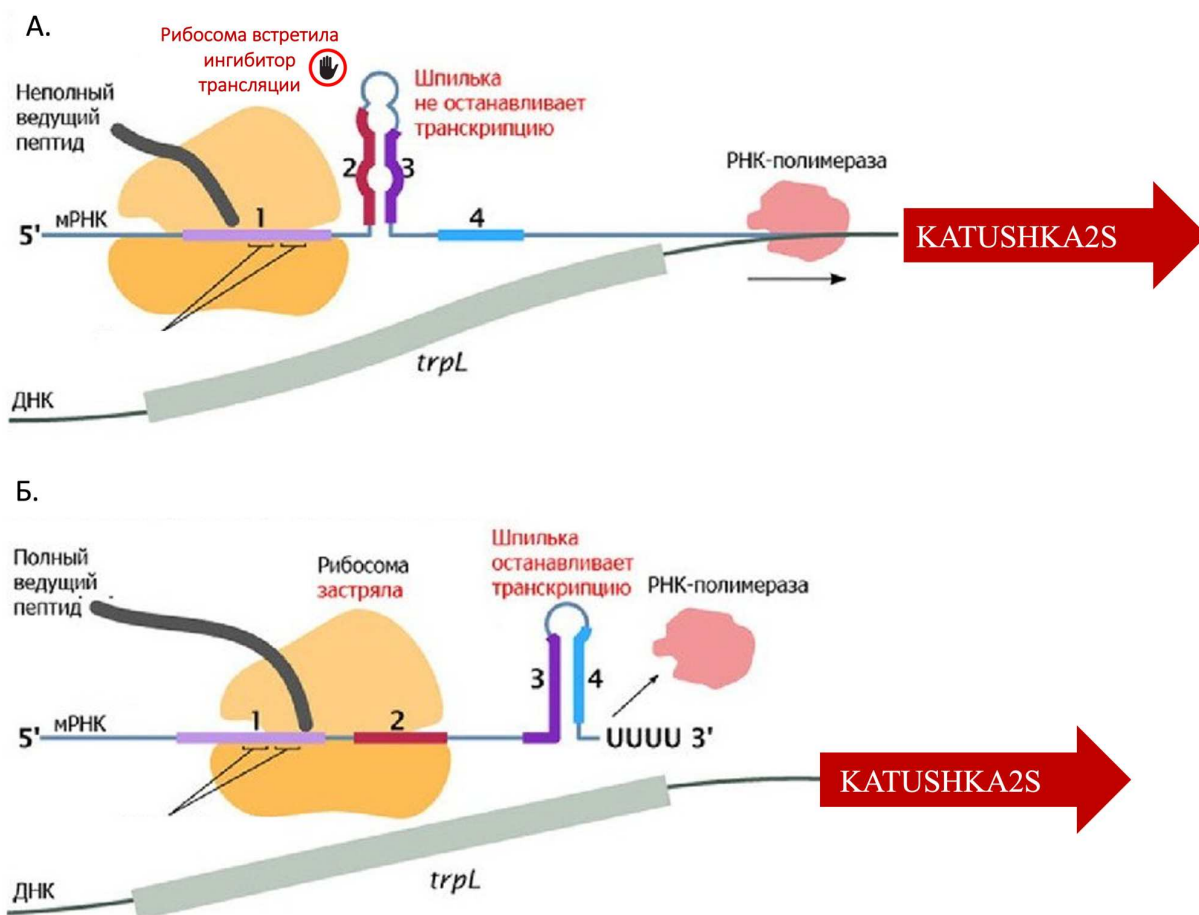


Рис. 9. Принцип действия трансляционной части репортерной системы. А – в присутствии ингибитора трансляции, Б – без трансляционного ингибитора.

Стоит также отметить, что эта репортерная система работает в сублетальных концентрациях антибиотика, так как в таком случае в клетке одновременно присутствуют рибосомы, остановленные антибиотиком и позволяющие сработать аттенюатору, а также рибосомы, не поврежденные антибиотиком способные транслировать флуоресцентный белок.

В основе принципа работы второй части репортера лежит такая клеточная реакция на стресс как SOS-ответ. Гены экспрессирующиеся в ходе SOS-ответа регулируются репрессором LexA, гидролиз которого ведет к активации таких промоторов как *su1A*, *recA*, *umuDC* и других. После запуска SOS-ответа, в клетке активируются процессы репарации ДНК. Чаще всего SOS-ответ возникает при образовании одноцепочечной ДНК в ходе повреждения. Далее с этим участком ДНК связывается белок RecA, комплекс ДНК с белком RecA ведет к протеолизу LexA и запуску SOS-ответа [74] (Рис. 10). Затем в случае успешной репарации ДНК, вновь синтезируется белок LexA и связывается с регуляторными участками.

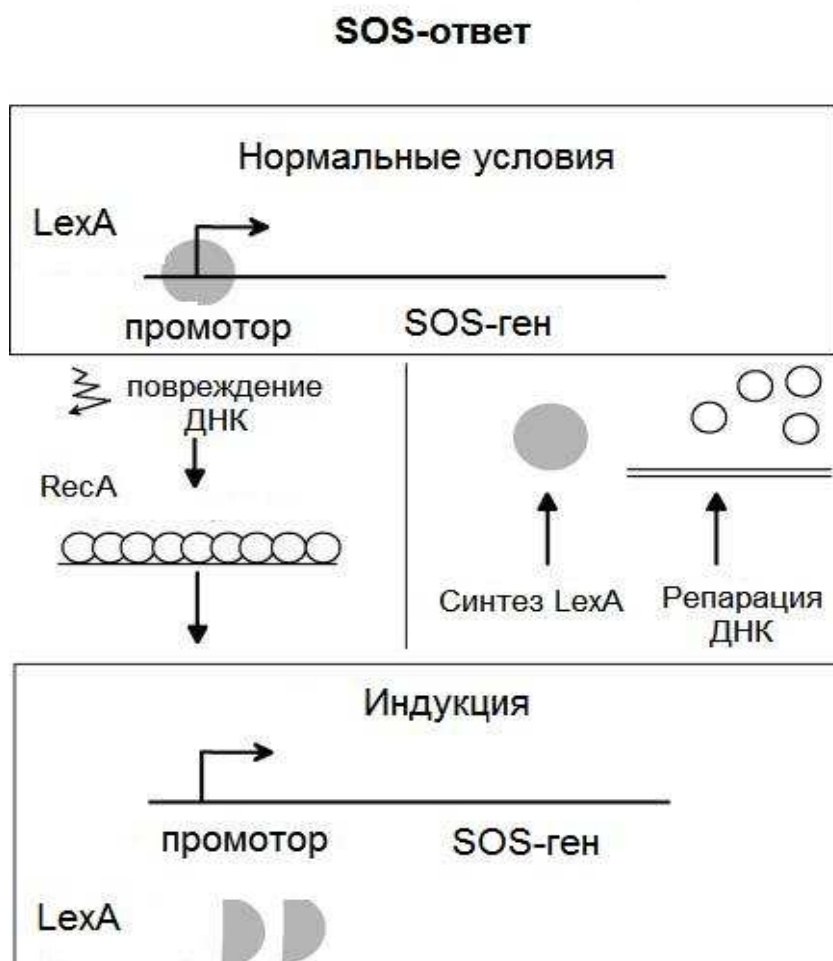


Рис. 10. Индукция SOS-ответа [75].

Ранее данный подход уже был использован для поиска ДНК повреждающих агентов [76].

В репортерной системе pDualrep2 используется промотор SulA. После него закодирован флуоресцентный белок TurboRFP. Таким образом, если в клетке запускается SOS-ответ, то помимо экспрессии генов, отвечающих за репарацию ДНК, происходит и экспрессия гена флуоресцентного белка (Рис. 11, Б).

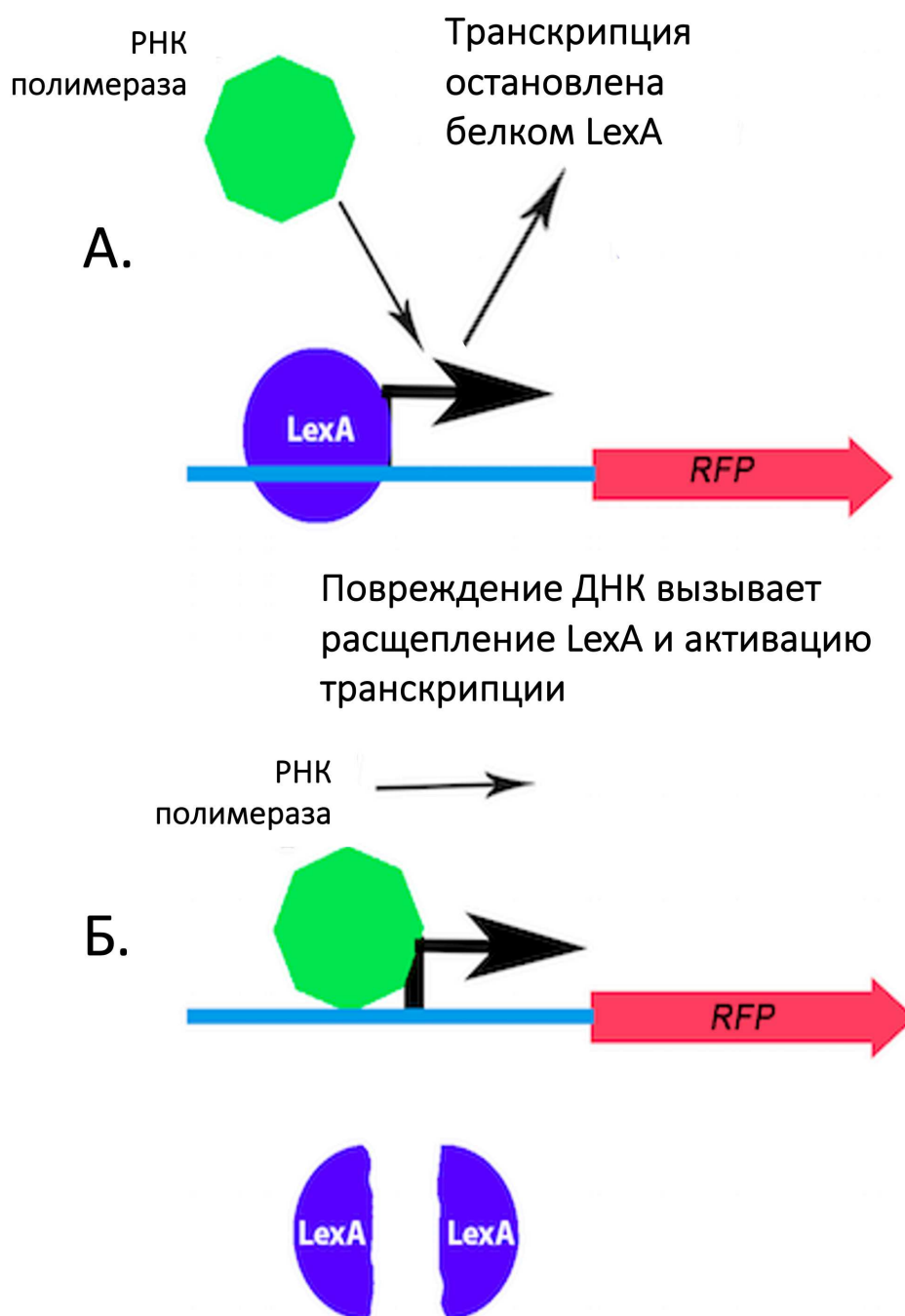


Рис. 11. Индукция SOS-ответной части репортерной системы. А – без антибиотика, Б – в присутствии ДНК повреждающего агента.

Есть несколько подходов к визуализации сигнала при использовании репортёрных систем. Это могут быть ферменты, превращающие субстрат в характерно окрашенный продукт. Например, часто использует фермент бетта-галактозидаза, превращающая бесцветный субстрат X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид) в ярко синий 5,5'-диbromo- 4,4'-дихлоро-индиго[77], образование которого можно увидеть невооружённым глазом. Следующий подход — это использование флуоресцентных белков. Процесс флуоресценции связан с нетепловым свечением вещества, происходящим после поглощения им энергии возбуждения. Наиболее известным представителем данной группы белков является GFP [78]. Третьим наиболее используемым подходом является образование различных люцифераз, способных разлагать люциферин или подобные субстраты с испусканием света. Наиболее известным представителем этой группы является люцифераза светлячка Fluc [79].

В репортерной конструкции pDualrep2 визуализация осуществлялась за счет двух флуоресцентных белков TurboRFP и Katushka2S. Оба белка являются «красными». Тем не менее, если посмотреть на их спектральные характеристики, можно увидеть, что пики поглощения и испускания расходятся (Рис. 12).

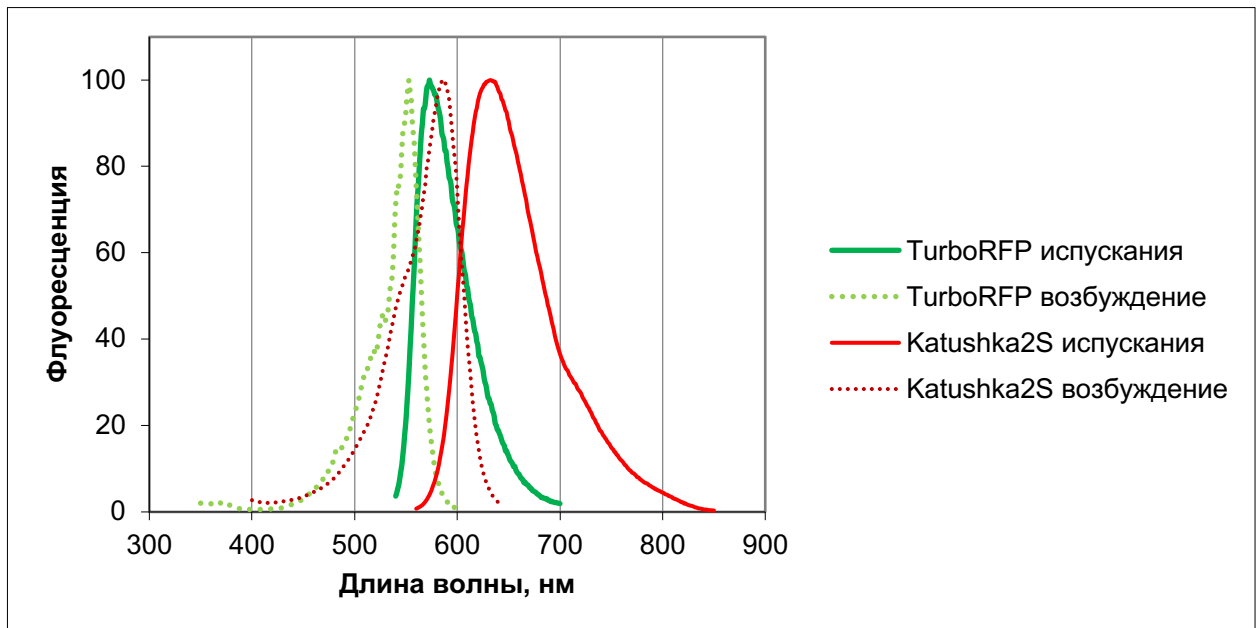


Рис. 12. Спектральные характеристики белков TurboRFP и Katushka2S.

В качестве маркера селективности используется ген  $\beta$ -лактамазы, дающий устойчивость к ампициллину. Схема репортерной конструкции представлена на Рис. 13.

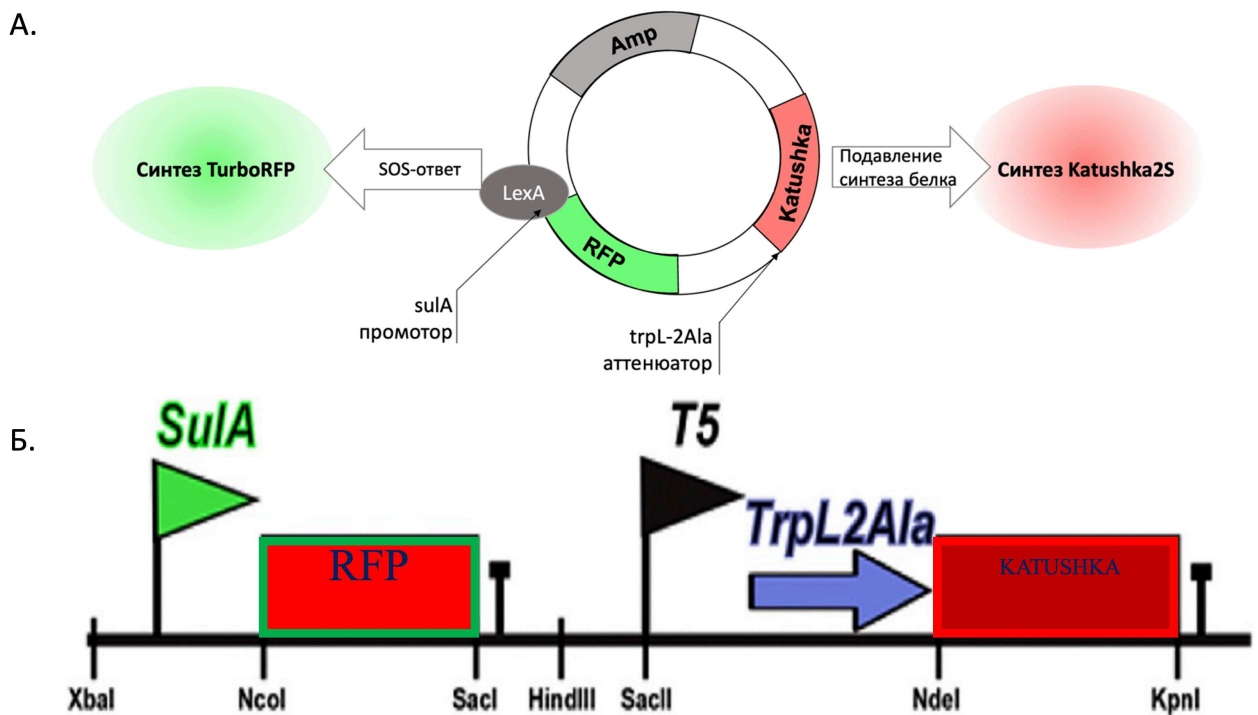




Рис. 13. Плазмида pDualrep2. А – схема плазмиды, на которой обозначен ген устойчивости к ампициллину и гены флуоресцентных белков, а также возможные схематично изображен принцип действия репортёрной системы. Б – схема плазмиды с указанием ключевых регуляторных элементов и сайтов рестрикции. Треугольниками обозначены промоторы зеленым SulA, черным T5. Красные прямоугольники флуоресцентные белки прямоугольник с зеленой рамкой RFP, с красной рамкой – Katushka2S. Черный квадрат терминатор гена *trnB*. Фиолетовая стрелка – это регуляторный элемент TrpL2Ala сконструированный на основе лидерного пептида триптофанового аттенюатора.

Для поиска антибиотиков используются штаммы *E.coli* JW5503 с удаленным геном *tolC* ( $\Delta tolC$ ) [80] и *E.coli* *lptD* mut (*lptD*) [81] содержащих репортерную плазмиду pDualrep2. Ген *tolC* кодирует компонент наружной мембраны нескольких транспортеров антибиотиков [82]. Данный штамм был взят из коллекции Keio [80]. Строение эффлюксной помпы продемонстрировано на Рис. 14. Полученный штамм показал повышенную чувствительность к широкому спектру антибиотиков. В некоторых случаях МИК уменьшался более чем в 100 раз [81]. Второй штамм имеет мутацию в гене *lptD*, в нем удалены кодоны с 330 по 352. LptD является важным белком, функционирующим на конечных стадиях сборки липополисахаридов во внешней мембране [83]; делеция 23 аминокислот нарушает его функции, делая наружную мембрану более проницаемой для антибиотиков [84]. Делеция в гене *lptD* значительно повысила чувствительность полученного штамма к ряду антибиотиков, включая высокомолекулярные соединения, такие, как тиострептон с молекулярной массой 1665 Да [81].

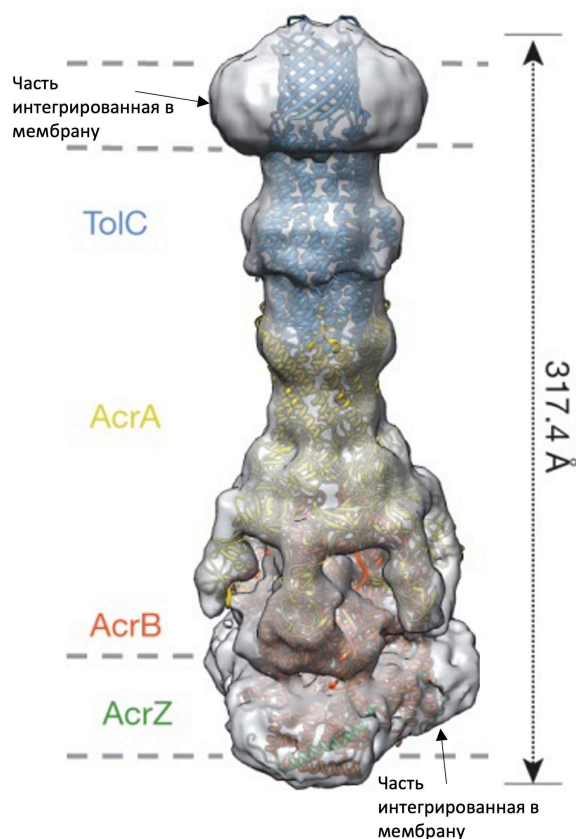


Рис. 14. Реконструированная карта и псевдоатомная модель. TolC и AcrBZ представляют собой гомотримеры, которые связывают шесть протомеров AcrA с образованием сборки с массой белка 771 кДа. AcrA имеет сложную структуру из четырех линейно прерывистых доменов, соединенных гибкими линкерами [85].

Суммируя детальное описание репортера, принцип работы данной конструкции заключается в следующем: если в среде с клетками *E. coli*  $\Delta$ tolC или lptD содержащими плазмиду pDualrep2 появляется антибиотик вызывающий SOS ответ, то индуцируется синтез флуоресцентного белка RFP (Рис. 13, А). Однако если в среде с клетками появляется антибиотик, нарушающий работу рибосомы, то индуцируется синтез флуоресцентного белка Katushka2S. Важно отметить, что детектировать сигналы от антибиотиков, работающих по различным механизмам возможно на одной и той же чашке Петри с агаризованной средой LB с нанесенным на нее в виде газона клеток *E. coli*  $\Delta$ tolC или lptD содержащих плазмиду pDualrep2. Это показано на примере использования

левофлоксацина и эритромицина. Левофлоксацин является ингибитором работы гиразы и запускает SOS ответ, а следовательно, стимулирует индукцию синтеза RFP. Эритромицин связывается с 50S-субъединицей рибосомы и останавливает синтез белка, в результате чего запускается синтез *Katushka2S*. На чашку Петри с агаризованной средой LB покрытую клетками штамма *E. coli* BW25113 содержащими плазмиду *pDualrep2*, внесли небольшое количество антибиотиков левофлоксацина (слева) и эритромицина (справа). Затем чашка была отсканирована в канале *су3* (605 нм) для детекции флуоресценции RFP (Рис. 15, верхний прямоугольник). После эта же чашка была отсканирована в канале *су5* (647 нм) для детекции флуоресценции *Katushka2S* (Рис. 15, средний прямоугольник). Сумма сигналов с этих каналов представлена ниже (Рис. 15, нижний прямоугольник), где RFP придан зеленый цвет, а *Katushka2S* придан красный цвет.

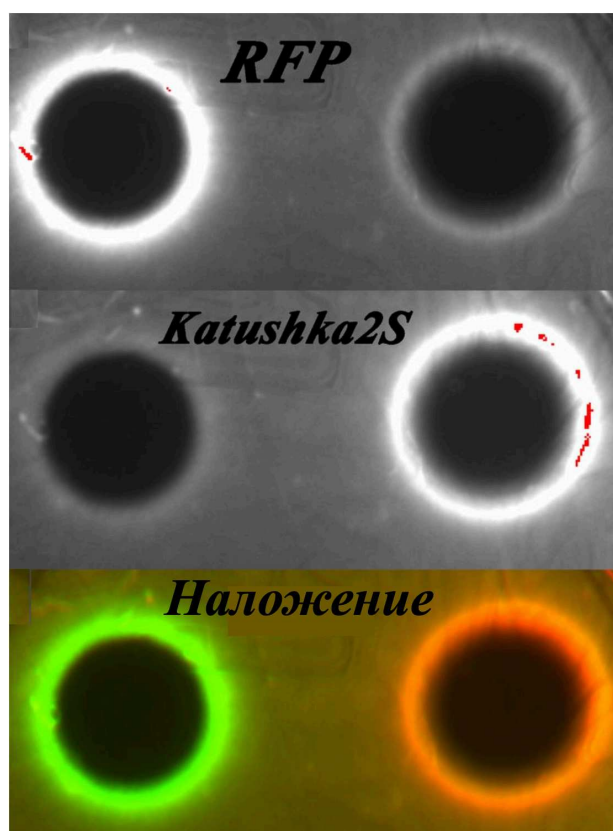


Рис. 15. Индукция репортерной системы ингибитором трансляции эритромицином (Ery, 7,5 мкг) и гиразным ингибитором левофлоксацином (Lev, 0,05 мкг) на чашке Петри с агаризованной средой LB с газоном клеток штамма

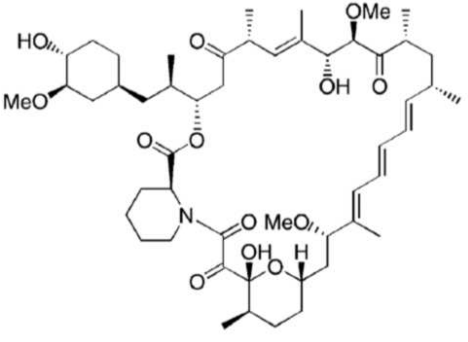
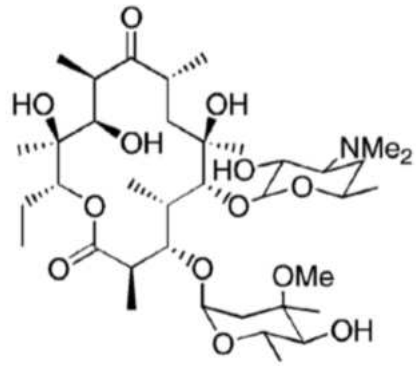
*E. coli*  $\Delta$ tolC, содержащих плазмиду pDualrep2. Инкубацию проводили в течение 18 ч, изображение получено при помощи сканера флуоресценции ChemiDoc® BIORAD в каналах cu3 и cu5 (верхний и средний прямоугольники соответственно). На нижнем прямоугольнике, для удобства анализа данных каналам присвоены псевдоцвета, зеленым псевдоцветом показана флуоресценция RFP, красным псевдоцветом показана флуоресценция Katushka2S.

## **1.3 Сводная характеристика веществ, структурно похожих на тетраценомицин X**

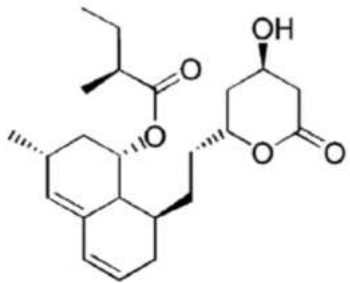
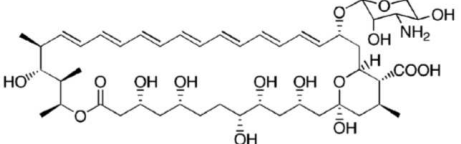
### *1.3.1 Поликетиды*

Поликетиды – это класс веществ природного происхождения, которые вызывают несомненный научный интерес. Помимо того, что они характеризуются значительным функциональным и структурным разнообразием, они также обладают множеством важных с точки зрения медицины свойств. В частности, они проявляют антибиотическую активность (Таб. 1), противоопухолевую активность, противогрибковое действие, а также могут проявлять свойства иммунодепрессантов.

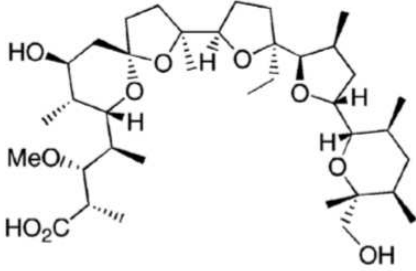
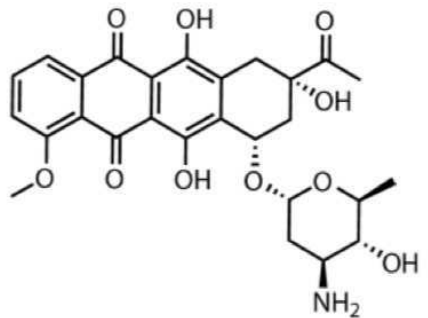
Таб. 1. Некоторые виды поликетидных антибиотиков [11]

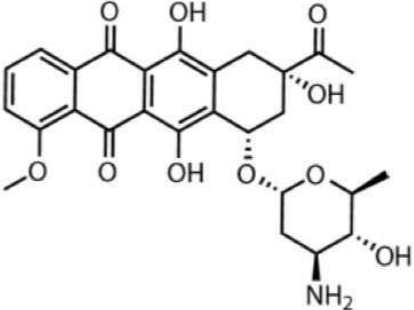
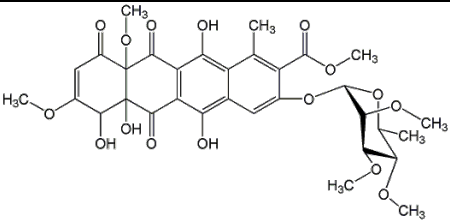
Название	Формула	Продуцент	Механизм	МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация)
Рапамицин		<i>Streptomyces rapamycinicus</i>	Ингибитор активации Т-лимфоцитов у млекопитающих[86] Антибактериального эффекта нет[87]	-
Эритромицин А		<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Ингибирует синтез белка в бактериальной клетке, связываясь с 50S рибосомной субъединицей и блокируя пептидилтрансферазный центр.	E.coli BM2195[88] 2,048 ug/ml

Название	Формула	Продуцент	Механизм	МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация)
Афлатоксин В1	 <p>The image shows the chemical structure of Aflatoxin B1, a complex polycyclic molecule consisting of a coumarin ring system fused to a difuran ring system. It features a methoxy group (MeO) and several oxygen-containing functional groups.</p>	<i>Aspergillus flavus</i>	Само вещество не токсично[89], токсичен его эпоксид образующийся в клетке. Эпоксид алкилирует ДНК, чаще всего гуанин.	-

Название	Формула	Продуцент	Механизм	МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация)
Ловастатин	 The chemical structure of Lovastatin is a complex polycyclic molecule. It features a hexahydronaphthalene core with a decalin-like system. Attached to this core are a side chain with a methyl group and a propyl group, and a lactone ring fused to a six-membered ring containing a hydroxyl group and a methyl group.	<i>Aspergillus terreus</i>	Ингибитор биосинтеза холестерина в эукариотических клетка[90]	-
Амфотеризин В	 The chemical structure of Amphotericin B is a long-chain polyene macrolide. It consists of a long, unsaturated hydrocarbon chain with multiple conjugated double bonds. This chain is attached to a complex ring system that includes a decalin core, a lactone ring, and a side chain with a hydroxyl group, a methyl group, and a carboxylic acid group.	<i>Streptomyces nodosus</i>	Связывает эргостерол в мембранах грибных клеток и образует трансмембранный канал через который могут вытекать компоненты клетки[91]	-



Название	Формула	Продуцент	Механизм	МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация)
Моненсин А		Streptomyces cinnamomensis	Является ионофором. Активность объясняется изменением рН и натрий- калиевого баланса в клетке[92].	S. aureus NCTC 4163[93]  2 ug/ml
Даунорубин		Streptomyces coeruleorubidus	<i>Является ДНК повреждающим антибиотиком. Встраивается между парами оснований в ДНК, что ингибирует топоизомеразу II, так как стабилизирует комплекс ДНК-топоизомераза II [94], [95].</i>	-

Название	Формула	Продуцент	Механизм	МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация)
Тетрацеклин	 <p>The image shows the chemical structure of Tetracycline, a tetracycline antibiotic. It consists of a tetracyclic core with a dimethylamino group and a dimethylglycyl side chain.</p>	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Ингибирует трансляцию у бактерий. Препятствует образованию комплекса тРНК с рибосомой[96].	<i>E. coli</i> ATCC 25922 2 ug/ml [97]
Еллорамацин А	 <p>The image shows the chemical structure of Elloramycin A, a macrolide antibiotic. It features a 14-membered macrolide ring with multiple methyl and methoxy substituents and a complex side chain.</p>	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Внедряется в молекулу ДНК[98].	-

### 1.3.2 Тетрациклин

Тетрациклины - группа антибиотиков, относящихся к классу поликетидов, близких по химическому строению и биологическим свойствам.

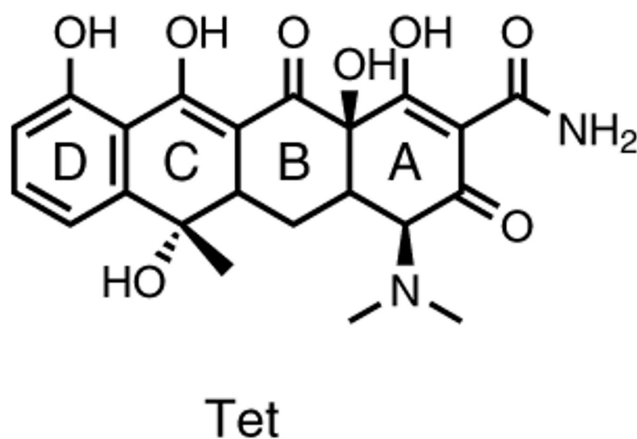


Рис. 16. Структура тетрациклина.

В конце 1940-х годов активный поиск антибиотиков привел к открытию многих молекул с антибиотической активностью [99] среди которых были в том числе хлортетрациклин и окситетрациклин – первые изученные антибиотики тетрациклинового ряда. Позднее были описаны и другие антибиотики этой группы как природного происхождения (тетрациклин, деметилхлортетрациклин), так и их полусинтетические модификации (метациклин, доксициклин, миноциклин). Несмотря на существование около тысячи производных тетрациклина, только семь из них нашли широкое применение в медицине и ветеринарии [100, 101]. Внутри группы антибиотиков тетрациклинового ряда принято выделять два поколения: к первому относят молекулы, описанные в период 1948-1957 гг, а ко второму – в 1965-1972 гг [100, 102].

Тетрациклины были первой большой группой противомикробных агентов, для которых использовался термин «широкий спектр», т.е. обладание активностью против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая облигатных анаэробов. Широкий

спектр активности и относительная безопасность тетрациклинов привели к их активному использованию в терапии инфекций человека, животных, а так же некоторых растений и насекомых, и к 1980 году производство тетрациклина достигло 5000 тонн в год [101]. Тем не менее, в дальнейшем было принято ограничение на столь массовое использование тетрациклинов, вызванное появлением устойчивости микроорганизмов к этим антибиотикам [103, 104].

Антибиотическая активность тетрациклинов используемых, в медицинской практике обусловлена подавлением синтеза белка в клетке в процессе трансляции [103, 105, 106]. Тетрациклины делятся на 2 группы: атипичные тетрациклины, являющиеся слабыми ингибиторами синтеза белка, и типичные тетрациклины, например, тетрациклин (Tet), ингибирующий аккомодацию А-сайтовой тРНК. Далее речь будет идти только о типичных тетрациклинах. Первичный сайт связывания тетрациклина расположен на головке 30S субъединицы (Рис. 17 А), где антибиотик взаимодействует с нерегулярной малой бороздкой h34 и петлей h31 (Рис. 17 А, Б) [57, 107].

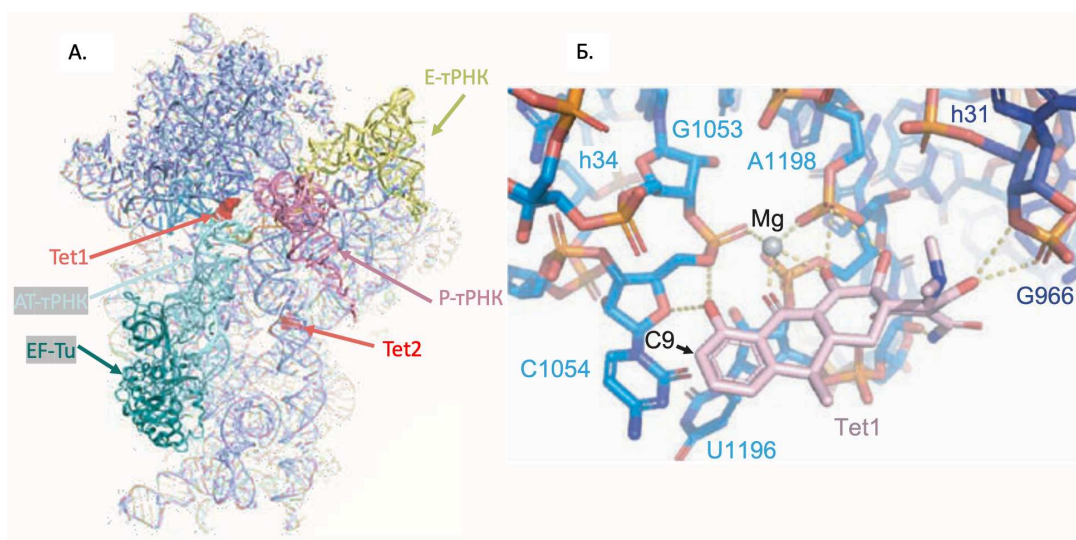


Рис. 17. Тетрациклины ингибируют доставку тРНК к А-сайту рибосомы. А - Обзор первичного (Tet1) и вторичного (Tet2) сайтов связывания тетрациклина на субъединице 30S относительно Р-тРНК (розовый), Е-тРНК (желтый) и АТ-тРНК связанной с EF-Tu (бирюзовый). мРНК показана оранжевым цветом, а спирали 31 и 34 окрашены в темно-синий и светло-синий цвета соответственно. Б - В первичном сайте связывания полярная сторона Tet

может образовывать водородные связи (пунктирные линии) исключительно с остовом нуклеотидов в h34 (голубой) и h31 (темно-синий) 16S рРНК [11].

Сайт связывания Tet1 слегка перекрывается с антикодоновой петлей А-тРНК (Рис. 17 А, Б), что согласуется с наблюдением, что Tet предотвращает стабильное связывание тройного комплекса aa-тРНК•EF-Tu•ГТФ. к А-сайту рибосомы, а при диссоциации EF-Tu•ГТФ aa-тРНК, которым удалось доставиться к сайту декодирования на 30S-субъединице, не могут разместиться на 50S-субъединице и теряются из рибосомы [108].

Широкий спектр действия Tet согласуется со способом взаимодействия Tet1 с рибосомой, а именно с тем, что Tet1 взаимодействует только с сахарофосфатным остовом нуклеотидов в h31 и h34, и поэтому контакты не зависят от последовательности. Кроме первичного сайта связывания тетрациклина с рибосомой были обнаружены так же и вторичные [107], однако они не имеют отношения к ингибирующему механизму тетрациклинов.

Антибиотическое действие соединений этой группы характеризуется определенной селективностью и ведет к остановке синтеза бактериальных белков. Однако, не смотря на то, что тетрациклин практически не связывается с 80S рибосомами млекопитающих [109], он влияет на рибосомы митохондрий. Способность тетрациклинов ингибировать митохондриальный [110] синтез белка не вызывает удивления, в силу их эндосимбиотического происхождения от эубактерий. Таким образом, специфичность действия определяется не только различиями в структуре рибосом прокариот и эукариот, но и другими факторами. Другим важным отличием, определяющим специфичность действия тетрациклинов, является факт, что антибиотик легко проникает в бактериальные клетки и концентрируется в них, в то время как для клеток млекопитающих это не характерно.

Существуют три различных биохимических механизма устойчивости к антибиотикам тетрациклинового ряда:

- 1) Энергозависимый транспорт антибиотика из клетки посредством белков устойчивости, интегрированными в мембрану клетки [111].

- 2) Защита рибосом, препятствующая продуктивному связыванию тетрациклинов с 30S субъединицей [112]. Были сообщения о мутациях, вызывающих устойчивость к Tet, в положении 1058 в h34, рядом с сайтом связывания Tet1, или в результате делеции трех оснований, 965–967 в h31, непосредственно в сайте связывания Tet1 [113-115].
- 3) Химическая модификация тетрациклина в ходе реакции требующей присутствия кислорода, инактивирующая молекулу тетрациклина [112].

Наиболее распространенным является механизм, связанный с выкачиванием антибиотика из клетки. В то же время, механизм, подразумевающий химическую модификацию тетрациклина, встречается достаточно редко и остается малоизученным.

### 1.3.3 Даунорубицин и Доксорубицин

В 1962 году даунорубицин был выделен из штаммов *Streptomyces caeruleorubidus* во Франции. Примерно в тот же период то же самое вещество было выделено из штаммов *Streptomyces peucetius* в Италии и в Советском Союзе. При открытии антибиотик был назван рубидомицином, дауномицином и рубомицином, а теперь известен как даунорубицин (DNR). Формула представлена на Рис. 18.

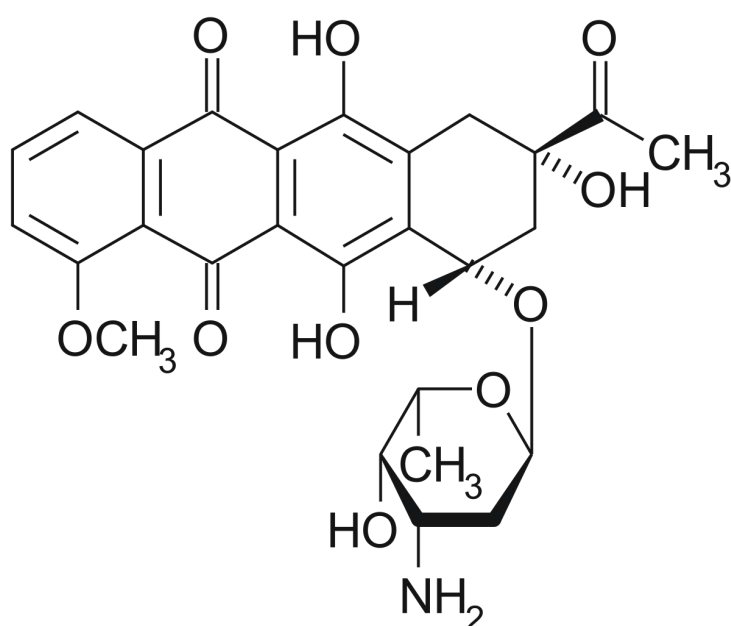


Рис. 18. Структура даунорубицина.

Этот гликозидный антибиотик, принадлежащий к группе антрациклинов, обладает очень сильным антилейкемическим действием. Это был первый препарат, дающий длительную ремиссию, что можно было рассматривать как полное выздоровление при некоторых острых лейкозах, которые до открытия антрациклинов всегда были летальны.

Механизм действия DNR связан с образованием интеркалирующего комплекса с ДНК. В 1965 году Календи и соавторы [116] описали увеличение относительной вязкости сложного ДНК-DNR при увеличении дозы DNR. В то

же время константа седиментации имеет тенденцию к уменьшению. Присутствие DNR увеличивает температуру плавления ДНК.

После добавления ДНК к DNR в растворе можно наблюдать изменения видимых и УФ-спектров DNR. Спектр смеси ДНК-DNR отличается от спектров этих веществ по отдельности. К тому же, DNR имеет типичный спектр флуоресценции с возбуждением при 485 нм и эмиссией при 580 нм. Добавление ДНК сопровождается тушением флуоресценции. Две химические группы: гидроксильная группа хромофора и аминогруппа сахара (даунозамин) ответственны за связь DNR с ДНК. Можно постулировать две разные связи: одна включает интеркаляцию хромофора между соседними базовыми парами ДНК, а другая - аминогруппу сахара. Последнее подтверждается изменениями вязкости, вызванными DNR, а не N-ацетилпроизводным[116].

Подробное изучение интеркаляции DNR в молекулу ДНК показало, что в ходе этого процесса происходит локальное разматывание двойной спирали[117] и шаг спирали увеличивается концентрационно-зависимо, закрепленного на ДНК[118]. На основании экспериментальных данных была построена гипотетическая модель процесса, в которой даунозамин находится в большой канавке и сбоку от канавки, близкой к цепочке фосфатов сахара, что позволяет осуществить взаимодействие.

#### 1.3.4 Тетраценомицины

Тетраценомицины представляют собой семейство тетрациклических нафтаценхинонов с сильно гидроксильрованным циклогексеноновым фрагментом. Интерес к тетраценомицинам был вызван тем, что они показали сильную противоопухолевую активность. Группа тетраценомициновых антибиотиков была обнаружена и выделена из *Streptomyces glaucescens* научной группой Зика как результат скрининга [9]. Основным компонентом смеси тетраценомициновых антибиотиков был тетраценомицин С (Рис. 19), антибиотик узкого спектра действия похожий по действию на антрациклиновые антибиотики.



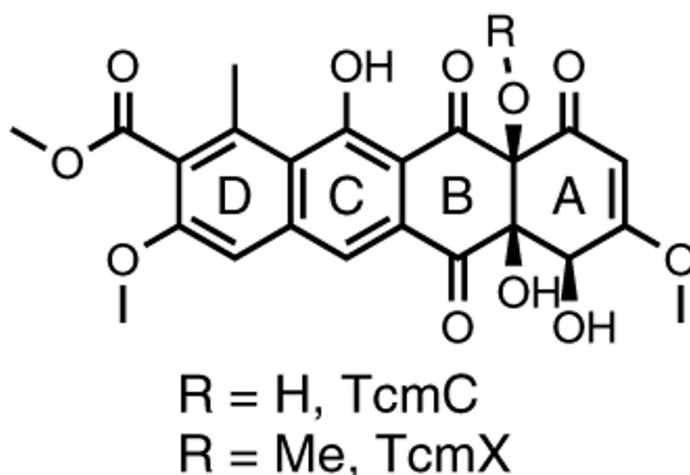


Рис. 19. Структура тетраценомицинов.

Группа тетраценомициновых антибиотиков имеет довольно узкий спектр биологической активности [9]. В ходе теста на дисках против разных микроорганизмов была обнаружено, что нет активности или она низкая активность против Грамм минус бактерий и дрожжей. Однако эти антибиотики продемонстрировали высокую активность против Грамм положительных бактерий таких как *Streptomyces*. Тетраценомицин С показывает антибиотическую активность [119] на ряду с высокой цитотоксичностью на фибробластах куриных и мышинных эмбрионов, а так же на клетках лейкемии Р-388 [120]. Предполагается, что тетраценомицин С интеркалирует ДНК. Внедрение тетраценомицина С в структуру ДНК вызывает остановку ДНК полимеразы по механизму схожему с акласиномицином А [121] и неотрамицином, а также это скорее всего и является причиной цитотоксичности и поэтому он может быть эффективен против опухолей.

Несмотря на предположение об интеркаляции ДНК Тетраценомицином С, на практике это до сих пор подтверждено не было.

Для наиболее изученного представителя группы – тетраценомицина С расшифрована схема синтеза (Рис. 20). Биосинтез состоит из 9 стадий, а

предшественником является малонил-КоА, который образуется из ацетил-КоА в ходе синтеза жирных кислот.

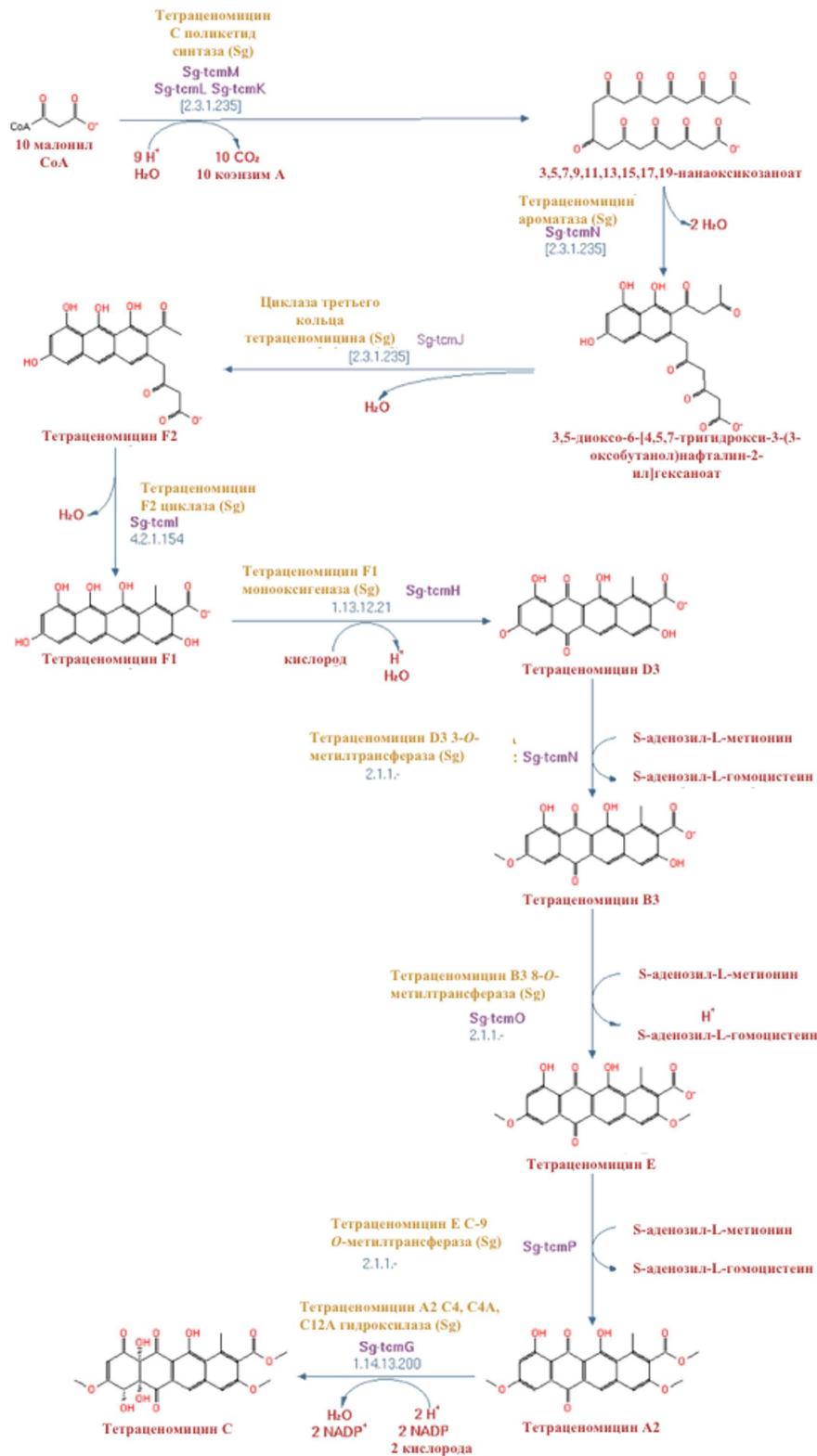


Рис. 20. Схема биосинтеза тетраценомицина С.

На первой стадии происходит образование декакетида. Было выявлено, что в этой стадии принимают участие три белка. Два из них это  $\beta$ -кетоацилсинтазы типа II (tcmK и tcmL), а третий является белком ацетилносителем (tcmM).

Оба tcmK и tcmL подобны гену FabB *Escherichia coli*, который кодирует  $\beta$ -кетоацилсинтазу, участвующую в биосинтезе жирных кислот [122]. Гены tcmK и tcmL были клонированы и экспрессированы в *Streptomyces lividans*, а затем были выделены и очищены рекомбинантные белки [123]. В результате был сделан вывод о том, что эти два белка образуют гетеродимерный комплекс  $\alpha\beta$ , а также что ацетил-СоА не может служить затравкой в образовании тетраценомицина, для этого подходит только малонил-СоА, который декарбоксилируется после связывания.

В ходе следующей стадии происходит циклизация декакетида с образованием двух колец. Эта реакция осуществляется бифункциональной ароматазой, которая закодирована в гене tcmN. Эта ароматаза состоит из двух независимых доменов. На С-концевом участке белка закодирована метилтрансфераза, в то время как на N-концевом участке белка закодирована ароматаза аналогичная ароматазе actVII из *Streptomyces coelicolor* A3 [124].

Было выявлено, что N-концевой пептид взаимодействует с комплексом покетида синтазы тетраценомицина С, образуя частично циклизированный интермедиат, затем происходит ароматизация поликетидов путем реакций конденсации и дегидратации.

В ходе следующего этапа снова происходит циклизация. Однако белок который осуществляет этот процесс пока не установлен. Было предположение, что за эту реакцию отвечает ген tcmJ, удаление более 50% которого значительно снижало синтез тетраценомицина F2, однако полного исчезновения продукта не происходило [125]. В дальнейшем было установлено, что ген не проявляет циклической активности и было заявлено, что tcmJ является «белком поликетидного синтеза без известной функции» [123].

В ходе следующей реакции происходит циклизация с образованием D-кольца тетраценомицина C. Было выявлено, что эта реакция осуществляется тетраценомицин F2-циклазой, которая закодирована в гене *tcmI* [125]

Тетраценомицин F2-циклаза является тримерным белком в растворе его молекулярная масса составляет 37,5 кДа. Было показано, что фермент осуществляет реакцию циклизации тетрацираценомицина F2 до тетрацираценомицина F1 при pH 6,5 и ниже [126]. Для *TcmI* так же установлена рентгеновская структура с разрешением 1,9Å, показывающая, что белок обладает димерной  $\beta\alpha\beta$  ферредоксино-подобной структурой. Также был проведен поиск оснований находящихся в каталитическом центре в ходе которого было показано, что этот белок управляет химической циклизацией, наравне с предоставлением каких-либо каталитических групп [127].

В ходе следующего этапа происходит окисление натрафенола тетраценомицина F1 до 5,12-нафтаценхионтетраценомицина D3. Это происходит при помощи оксигеназы, закодированной в гене *tcmH* [125].

Для этого фермента стоит отметить, что он не обладает ни одной из известных простетических групп, таких как флавин или гем, а также не содержит ионы металлов, что не характерно для известных моноксигеназ. Дальнейшие исследования показали, что для активности фермента необходимы сульфгидрильные группы и гистидиновые остатки [128].

В ходе следующей стадии происходит перенос метильной группы на кислород при 3м атоме углерода. Эта реакция осуществляется бифункциональной ароматозаой, которая закодирована в гене *tcmN*. Эта ароматаза состоит из двух независимых доменов. На C-концевом участке белка закодирована метилтрансфераза, в то время как на N-концевом участке белка закодирована ароматаза аналогичная ароматазе actVII из *Streptomyces coelicolor A3* [124].

Частично циклизованное промежуточное соединение, образованное N-концевым доменом *TcmN*, не является субстратом для C-концевой 3-O-метилтрансферазы. Таким образом можно предположить, что событие

слияния генов, которое создало ген *tcmN*, не отражает никакой связи между стадиями биосинтеза, катализируемыми двумя разными доменами [124].

N-концевой домен *tcmN* позднее был клонирован и экспрессирован в *Escherichia coli*, а затем был выделен с помощью гистидинового довеска. Этот рекомбинантный белок был кристаллизован [129]. Была получена кристаллическая структура с разрешением 1,9Å N-концевого домена, на которой было показано, что фермент имеет внутренний карман, способный связывать поликетидный субстрат, состоящий из 20-ти атомов углерода. В исследовании также был проведен мутационный анализ для выявления остатков, важных для специфичности циклизации и катализа.

В следующей реакции происходит метилирование гидроксильной группы при 8м атоме углерода. Это превращение осуществляет метилтрансфераза, закодированная в гене *tcmO*.

Ген *tcmO* напоминает собой ген, кодирующий O-метилтрансферазу ацетилсеротонина, которая экспрессируется в шишковидной железе крупного рогатого скота. Функцией этой метилтрансферазы является перенос метильной группы на фенольный гидроксидный остаток [124]. В случае с метилтрансферазой *TcmO* реакция очень похожа.

В последующих исследованиях ген *tcmO* был экспрессирован в *Streptomyces coelicolor* CN999 вместе с актинорходин поликетид синтазным кластером. В ходе этих исследований было показано, что с помощью этой метилтрансферазы происходит перенос метильной группы на кислород при 3м атоме углерода в молекуле 3,8-дигидрокси-метилантрахинона карбоксилате [130].

На предпоследнем этапе образования тетраценомицина С происходит метирование карбоксильной группы при 9м атоме углерода. За это отвечает O-метилтрансфераза, закодированная в гене *tcmP*.

Стоит отметить, что O-метилтрансфераза *TcmP* не имеет сходства в последовательности с любыми другими белками в базах данных.

При проверке активности гена его клонировали и экспрессировали как в *Escherichia coli*, так и в *Streptomyces lividans*. Было выявлено, что при добавлении либо тетраценомицина В3, тетраценомицина Е или 8-О-метилтетраценомицина D3 к культурам *Streptomyces lividans*, экспрессирующих ген *tcmP*, все соединения метилировались на карбоксильную группу при 9м атоме углерода, поддерживая предсказанную активность фермента. Аналогичные результаты были получены с *Escherichia coli*, экспрессирующими *TcmP*. Также было доказано, что метилирование зависит от S-аденозил-L-метионина [131].

Заключительным этапом синтеза тетраценомицина С является окисление 4, 4а и 12а атомов углерода с появлением в этих местах гидроксильных групп. Эта реакция осуществляется гидроксилазой, закодированной в гене *tcmG*.

Белок *TcmG* имеет некоторое сходство с несколькими бактериальными гидроксилазами флавинового типа, которые действуют на ароматические субстраты, такие как ген *tfdBI* *Ralstonia eutropha* JMP134, который кодирует 2,4-дихлорфенол-6-монооксигеназу, с этим белком у *TcmG* 34,7% идентичности.

Ген *tcmG* клонировали и экспрессировали в *Streptomyces lividans*. После добавления тетраценомицина А2 к трансформированным культурам он превращался в тетраценомицин С, это подтверждает, что ген кодирует фермент, который катализирует тройное гидрокселирование тетраценомицина А2 [131].

В последующем исследовании ген *tcmG* клонировали и экспрессировали в *Streptomyces lividans* и установили, что фермент является мономерным и содержит кофактор FAD. Помимо этого он имеет явное предпочтение NADPH над NADH в качестве донора электронов [132].

В дальнейших исследованиях было показано, что 4 и 12а-ОН-группы продукта получены из двух отдельных молекул кислорода, тогда как группа 4а-ОН получена из молекулы воды [133]. Таким образом, вода одновременно

используется как субстрат, а также образуется из молекулярного кислорода во время катализа.

В более позднем исследовании фермент кристаллизовали [134] и показали, что он существует в виде гексамера. Не известно влияет ли олигомеризация или концентрация на функцию или механизм работы фермента.

Схема кластера генов, принимающих участие в биосинтезе тетраценомицина С представлена на Рис. 21.

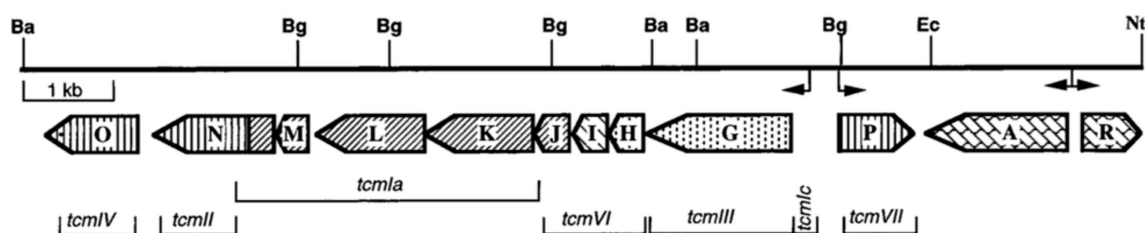


Рис. 21. Карта кластера генов синтеза тетраценомицина С в геноме *S. glaucescens*.

Как и в случае с биосинтезом даунорубицина, ароматический каркас тетраценомицина С строится на основе поликетидного синтеза II типа. В ходе изучения кластера генов, отвечающих за этот процесс в клетках *S. glaucescens*, была проанализирована последовательность генов *tcmK*, *tcmL* и *tcmM*, а также их гомологи *actI*, *actIII*, *actVII* и *actIV* полученные из ДНК продуцента гранатицина. Было показано, что *TcmK* / *ActI-Orf1*, *TcmL* / *ActI-Orf2* и *TcmM* / *ActI-Orf3*, а также все впоследствии обнаруженные представляют собой основные ферменты, участвующие в процессе поликетидного синтеза II типа. Кластер кодирует две субъединицы кетидсинтазы (KS) и ацил-несущий белок (ACP). Гены *ActI-Orf2* и *TcmL* кодируют субъединицы кетидсинтазы, причем несмотря на то, что они также известны как факторы удлинения цепи, в данном случае корректнее рассматривать их в качестве субъединиц одного синтазного комплекса, поскольку длина поликетидной цепи определяется обоими белками, а не только *ActI-Orf2* или *TcmL*. *ActIII* представляют собой кеторедуктазный-компонент (KR, этот фермент не требуется для биосинтеза тетраценомицина С), *ActVII* кодирует N-концевую треть *TcmN80*, а

продуктами ActIV являются ферменты ароматазы (ARO) и/или циклазы (CYC). Две субъединицы KS, ACP, KR и CYC представляют собой типичный поликетидсинтазный комплекс II типа. TcmJ и его гомологи не находят широкого распространения среди других кластеров генов PKS II типа, а его отсутствие в *S. glaucescens* или наличие в клонированных генах pKS tcm оказывает лишь количественное влияние на биосинтез поликетита. Гены tcmJ, tcmK, tcmL, tcmM и tcmN определяют образование тетраценомицина F2; tcmI контролирует образование четвертого кольца для завершения углеродного каркаса тетраценомицина C [135].

Устойчивость клетки к антимикробному действию тетраценомицина C достигается благодаря наличию генов tcmA и tcmR. Продукт TcmA, по-видимому, имеет несколько трансмембранных петель, которые могут позволить белку встраиваться в мембрану клетки и действовать как экспортер тетраценомицина C [124]. Экспрессия гена tcmA контролируется репрессором TcmR, вероятно, связывается с сайтами операторов в промоторе tcmA до тех пор, пока тетраценомицин C не свяжется с TcmR, высвободив его из ДНК и иницируя экспрессию tcmA. Когда уровень тетраценомицина C падает ниже некоторого порога, TcmR восстанавливает и репрессирует tcmA. Эта модель основана на хорошо изученном механизме устойчивости к тетрациклину, опосредованному генами tetAR [135]. В отличие от даунорубицина, биосинтез тетраценомицина C, по-видимому, не контролируется выделенными регуляторными генами. Было сопоставлено местоположение четырех промоторов и на было выдвинуто предположение что только один промотор контролирует экспрессию оперона tcmGHIJKLMNO [131].



## 1.4 Сводная характеристика веществ, продуцируемых родом *Actinoplanes* или структурно похожих на Аурапланин

Так как данная молекула не описана в литературе, то найти биосинтез и описание механизма действия не представлялось возможным. Однако был проведен поиск молекул, имеющих те же структурные фрагменты, что и аурапланин.

Представители рода *Actinoplanes* являются продуцентами антибиотиков рамопланин А2 и тейкопланин. Механизм действия рамопланина связан с блокировкой биосинтеза пептидогликана клеточной стенки, при этом он интересен тем, что он блокирует некоторые субстраты физически препятствуя их взаимодействию с ферментами [136, 137]. Механизм действия тейкопланина так же связан с ингибированием синтеза пептидогликана клеточной стенки [138, 139]. По структуре Рамопланин А2 (Рис. 22, А) и Тейкопланин (Рис. 22, Б) совсем не похожи на найденную молекулу – аурапланин.

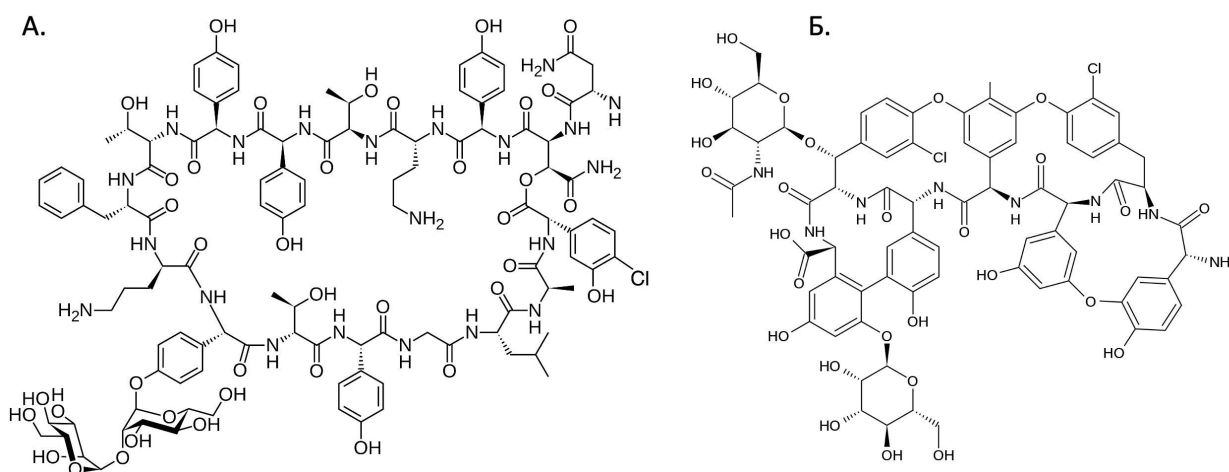


Рис. 22. Антибиотики продуцируемые представителями рода рода *Actinoplanes*. А – рамопланин А2, Б – тейкопланин.

В ходе поиска молекул со схожим строением в базах данных SciFinder и PubChem, было обнаружено некоторое количество молекул с похожими на

аурапланин мотивами. Производные пирролидин-2,4-диона (Рис. 23, А), тетрамовые кислоты довольно распространены среди природных соединений и отличаются широким спектром биологических активностей, однако при для соединений этой группы не характерно ингибирование трансляции [140]. Наиболее похожим структурно является Псеуротин А (Рис. 23, Б), однако его происхождение и функция заметно отличаются. Продуцентом данного антибиотика является *Bacillus* sp. FS8D, а механизм действия заключается в регуляции вторичных метаболитов глиомы и напрямую не влияет на синтез белка в клетках [141].

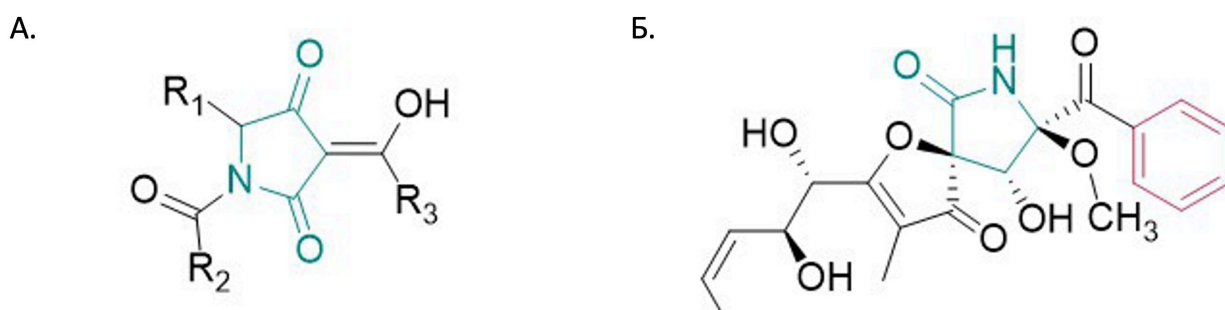


Рис. 23. Структурно схожие с аурапланином соединения. А – производные тетрамовой кислоты, Б – псеуротин А.

## 2. Материалы и методы

### 2.1 Используемое оборудование

Масс-спектры регистрировали на приборах:

HPLC-MS — «Acquity UPLC System» («Waters», США) и квадрупольного масс-спектрометра TQD (регистрация сигналов с помощью метода ESI MS; «Waters»).

HRMS — на приборе Bruker Apex Ultra методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных и отрицательных ионах.

NMR спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на приборе Bruker AVANCE с рабочей частотой 600 МГц с использованием растворителей  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$  и  $\text{DMSO-d}_6$ .

Хроматографическое разделение проводили на колонках сорбентом LPS-500-H.

Аналитическая HPLC проводилась на хроматографе марки Knauer с детектором UV-Vis марки K-2501 с использованием колонки Waters Sunfire C18 (5 мкм 4,6×250 мм), также на хроматографе марки Agilent 1260 с использованием колонки Phenomenex HPLC Luna C18 (5 мкм, 4,6×250 мм).

Препаративная HPLC проводилась на хроматографе марки Interchim Puriflash 4250 с использованием колонки ZORBAX SB-C18 (7 мкм, 21,2×250 мм).

Спектры поглощения регистрировали на приборе UV-1601PC фирмы Shimadzu.

Лиофильная сушка проводилась на приборе FreeZone 1 фирмы Labconco.

Определение мутности проводилось на денситометре BioSan Den-1B.

Количественный анализ в микробиологических экспериментах проводился на приборе Victor X5 2030 фирмы Perkin Elmer.

Гель-документирование проводилось на приборе ChemiDoc XRS+ фирмы Bio-Rad.

Высокороизводительный скрининг проводился на приборе Janus фирмы Perkin Elmer.

## 2.2 Реактивы и биопрепараты

В работе были использованы следующие реактивы: 2-меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (Serva); ампициллин, эритромицин, левофлоксацин, Tween-20, IGEPAL CA-630, глицерол, Tris-HCl (Sigma); додецилсульфат натрия, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочеви́на, персульфат аммония, ацетат натрия, хлорид аммония, хлорид натрия, борная кислота, гидроксид натрия, соляная кислота, фенол, хлороформ, хлорид магния, диметилсульфоксид (Invitrogen). Ацетонитрил (Panreac). Сорбент LPS-500Н (Техносорбент). [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-АТФ с удельной радиоактивностью 4000 Кюри/ммоль (ВО Изотоп, Россия). Ribolock, T4-полинуклеотид киназа (Thermo Scientific). AMV RT (Roche). Glycoblue(Ambion). Немо KlenTaq ДНК полимеразы (New England Biolabs). Другие использованные реактивы и соли были производства фирм Merck и Serva. В работе использовали ферменты фирм: Roche (Франция), MBI Fermentas (Литва).

## 2.3 Буферы и растворы

**LB:** 1 % [w/v] бактотриптона; 0.5 % [w/v] дрожжевого экстракта; 1% NaCl.

**M9:** 12.8 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 3 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 г/л NaCl, 1 г/л NH<sub>4</sub>Cl, 1мМ MgCl<sub>2</sub>, 1мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.4% глюкозы.

**Агаризованная среда LB:** 1 % [w/v] бактотриптона; 0.5 % [w/v] дрожжевого экстракта; 1% NaCl; 1.5% бактоагара.

**ССГ (среда соево-глицериновая):** 1,5% [w/v] глицерин, 2,0% [w/v] соевый жмых.

0,2% [w/v] дрожжевой экстракт, 0,1% [w/v] NaCl, 0,5% [w/v] CaCl<sub>2</sub>, 0,1% [w/v] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

**ПДС (пептонно-дрожжевая среда):** 0,5% [w/v] пептон, 0,3% [w/v] дрожжевой экстракт, 0,2 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% [w/v] глюкоза.

**Ацетонитрил:** использовались растворы разной процентности, приготовленные на дистиллированной воде. Ацетонитрил использовался в концентрациях 10 % [w/v], 25 % [w/v], 50 % [w/v], 75 % [w/v], 100 % [w/v],

**Буфер для приготовления компетентных клеток ТВ:** 10 мМ PIPES, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl<sub>2</sub> pH 6,7.

**ТВЕ:** 100 мМ Tris-HCl; 100 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 мМ EDTA.

**Полиакриламидные гели для разделения РНК и ДНК:** 4-15% полиакриламид в смеси с 1/20 бисакриламида, 420 г/л мочевина, ТВЕ, 0.1% персульфат аммония, 0.1% ТЕМЕД.

**Лигазный буфер:** 50 мМ Tris-HCl (pH 7.6) при 25°C, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ DTT, 0.1 мМ спермидина.

**Буфер для нанесения продуктов обратной транскрипции:** 0,1% бромфеноловый голубой, 0,1% ксиленцианол, 20 мМ EDTA, 98% формамид.

**Pure System Buffer:** 9 мМ magnesium acetate, 5 мМ potassium phosphate (pH 7.3), 95 мМ potassium glutamate, 5 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ spermidine, 8 мМ putrescine, 1 мМ DTT.

**Буфера для ресуспендирования:** 0.3 М sodium acetate (pH 5.5), 5 мМ EDTA, 0.5% SDS.

**Буфера для пересадки:** 0.3 M sodium acetate (pH 5.5), 5 mM EDTA.

**Буфер для нанесения:** 1-ml stock solution contains 980 µl of formamide (deionized, nuclease-free, Ambion), 20 µl of 0.5 M EDTA (pH 8.0), 1 mg of bromophenol blue and 1 mg of xylene cyanol.

**Буфер для разбавления:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween-20, 0.5% IGEPAL CA-630, 50% глицерол.

**Сиквенсный буфер:** 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) при 25°C, 2 mM MgCl<sub>2</sub>

## 2.4 Используемые в работе штаммы и условия культивирования

Таб. 2. Используемые в работе штаммы.

Штаммы	Описание	Ссылка
<i>E. coli</i> BW25113	<i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>rrnB</i> <sup>T14</sup> , <i>ΔlacZ</i> WJ16, <i>ΔhsdR</i> 514, <i>ΔaraBAD</i> AH33, <i>ΔrhaBAD</i> LD78	[142]
<i>E. coli</i> JW5503	<i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>rrnB</i> <sup>T14</sup> , <i>ΔlacZ</i> WJ16, <i>hsdR</i> 514, <i>ΔaraBAD</i> AH33, <i>ΔrhaBAD</i> LD78, <i>ΔtolC:kan</i>	[80]
<i>E. coli</i> SQ110 <i>ΔtolC</i>	<i>ΔrrsH-aspU</i> , <i>ΔrrfG-rrsG</i> , <i>ΔrrfF-rrsD</i> , <i>ΔrrsC-trpT</i> , <i>ΔrrsA-rrfA</i> , <i>ΔrrsB-rrfB</i> , <i>ΔtolC:kan</i>	[81]
<i>Actinoplanes</i> sp. VKM Ас-2862		
<i>Amycolatopsis</i> sp. A23		

Штамм *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862 культивировался в течении 7ми суток на 28°C при постоянном перемешивании 200 об/мин на средах М9 и ПДС.

Штаммы *E. coli* культивировали в течении 18 часов на 37°C при постоянном перемешивании 200 об/мин на средах М9 и LB.

Штамм *Amycolatopsis* sp. A23 культивировался в течении 21 суток на 28°C при постоянном перемешивании 200 об/мин на среде ОРГ79.

В случае культивации штаммов на твердых средах использовались те же условия, кроме перемешивания.

## **2.5 Использование двойной репортерной системы**

### *2.5.1 Анализ механизма действия антибиотиков из химической коллекции.*

Для исследования механизма действия антибиотиков была использована репортерная система pDualrep2 [70]. Для проведения анализа ночную культуру клеток *E.coli* JW5503 [80], замороженную в 50% глицерине, разбавляли в 10 раз в жидкой среде LB и высевали газоном на чашки Петри с 1,5% LB-агаром и ампициллином (50 мкг/мл). Чашки подсушивали, а затем наносили на поверхность чашек по 96 образцов разных химических молекул (Рис. 24). Нанесение молекул осуществлялось при помощи роботизированной станции Janus (Perkin Elmer, США). Молекулы были предварительно растворены в диметилсульфоксиде (DMSO) до концентрации 20 мг/мл. Раствор каждой молекулы наносили до концентрации 30мкг действующего вещества. После нанесения чашки с клетками инкубировали 18 часов при температуре 37°C. Для визуализации результатов полученные чашки сканировали при помощи ChemiDoc (Bio-Rad, США) в каналах Cy3 (для детекции TurboRFP) и Cy5 (для детекции Katushka2S).

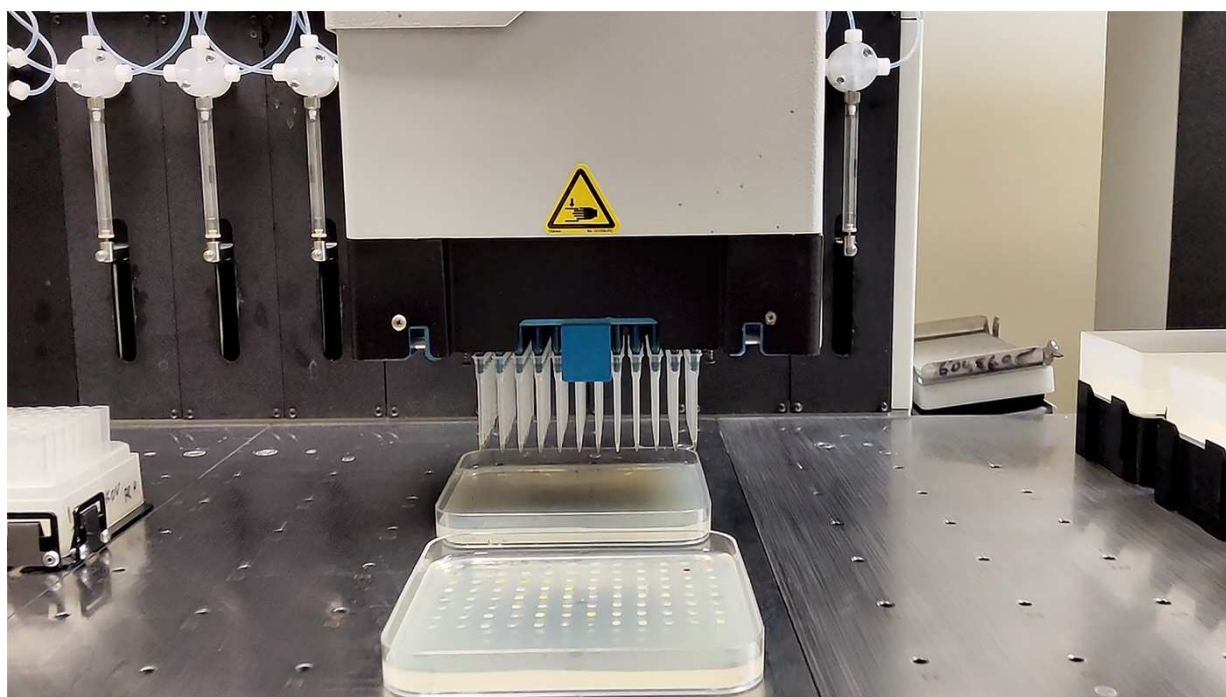


Рис. 24. Нанесение 96 индивидуальных молекул на чашки Петри с клетками репортера.

### *2.5.2 Анализ механизма действия природных образцов.*

Для исследования готовили чашки Петри с репортерной системой по методике, описанной в предыдущем разделе. Чашки подсушивали, а затем в слое агара делали отверстия диаметром 8мм в которые вносили по 100 мкл культуральной жидкости. После внесения образцов чашки с клетками инкубировали 18 часов при температуре 37°C. Для визуализации результатов полученные чашки сканировали при помощи ChemiDoc (Bio-Rad) в каналах Cy3 (для детекции TurboRFP) и Cy5 (для детекции Katushka2S).

## **2.6 Очистка действующего вещества из КЖ**

Для первичной очистки использовали твердофазную экстракцию на сорбенте LPS-500-H. Для элюции использовали растворы ацетонитрил-вода, проверку активности проводили на штамме  $\Delta tolC$ , трансформированном репортерной плазмидой pDualrep2.



В случае аурапланина из образца упаривали органический растворитель, затем доводили рН образца до слабощелочной среды при помощи аммиака. После этого образец дочищали при помощи экстракции в хлороформ примесей и производили очистки при помощи ВЭЖХ. Фракции тетраценомицина X сразу брались в разделении.

Для разделения на ВЭЖХ использовали колонку ZORBAX SB-C18 7 мкм, 21,2×250 мм, в качестве элюента - градиент ацетонитрила в воде 30→75% за 20 мин. Детекция УФ-поглощения вели на 205 и 400 нм .

## **2.7 Определение масс спектра действующего вещества**

Масс-спектрометрию осуществляли с помощью системы UPLC/MS/MS, состоящей из хроматографа «Acquity UPLC System» («Waters», США) и квадрупольного масс-спектрометра TQD (регистрация сигналов с помощью метода ESI MS; «Waters»), с градиентом 5–100% CH<sub>3</sub>CN в 20 мМ HCOOH за 4 мин.

## **2.8 Определение ЯМР спектра действующего вещества**

Спектры ЯМР записывали на спектрометре Bruker AVANCE, работающем при частоте протонов 600 МГц, при 298 К в D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub> или ДМСО-d<sub>6</sub> при концентрации образцов от 0,1 до 4 мМ. Отнесение сигналов <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N и <sup>13</sup>C при естественном содержании было получено с использованием следующего набора 2D-экспериментов: DQF-COSY, ROESY, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HMBC и <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H HMBC. Время перемешивания для эксперимента ROESY составляло 320 мс. Химические сдвиги <sup>1</sup>H измеряли по TMC (в CDCl<sub>3</sub> и ДМСО-d<sub>6</sub>) или DSS (в D<sub>2</sub>O) в качестве внутренних стандартов, а химические сдвиги <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N определяли косвенно, используя метод отношения γ [143]. Эксперимент <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H HMBC также был собран в CDCl<sub>3</sub> с использованием обогащенного <sup>15</sup>N аурапланина. Для обнаружения углерод-углеродных связей был проведен эксперимент гомоядерной корреляции <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C (<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C COSY) с широкополосной <sup>1</sup>H-развязкой на образце <sup>13</sup>C-обогащенного аурапланина в

D<sub>2</sub>O. Двумерные спектры ЯМР обрабатывали с помощью NMRPipe [144] с использованием стандартного протокола, который включает оконную функцию Лоренца-Гаусса, линейное предсказание вперед-назад и полиномиальную коррекцию базовой линии. Двумерные спектры анализировали с помощью NMRFAM-Sparky [145]. Спектры 1D ЯМР обрабатывали и анализировали с помощью программы Mnova (Mestrelab Research, Испания).

## 2.9 Измерение Минимальной Ингибирующей Концентрации

Измерение минимальной ингибирующей концентрации проводили в 96 луночных планшетах.

Для проведения эксперимента с 1 по 11 ряды планшета заполняли суспензией клеток *E. coli* JW5503, полученной путем разбавления ночной культуры в 200 раз. В первый ряд добавляли 200 мкл клеток, в последующие – 100 мкл. Двенадцатый ряд планшета заполняли питательной средой LB без клеток для контроля чистоты эксперимента.

В ячейки первого ряда добавляли 2 мкл тестируемого соединения (в концентрации 20 мг/мл), после чего готовили серию двукратных разведений в последующих рядах до десятого. Для этого 100 мкл смеси восьмиканальной пипеткой переносили из первой ячейки во вторую, смешивали и повторяли процедуру до достижения 10 ряда. В качестве контроля в каждый планшет в один из рядов добавляли вместо исследуемого вещества 2 мкл эритромицина (с концентрацией 5 мг/мл). После этого планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи с аэрацией 200 оборотов в минуту. О концентрации клеток судили по значению оптической плотности A<sub>600</sub>. Изменение проводили на планшетном ридере Victor X5 2030 (Perkin Elmer, США).

В качестве минимальной ингибирующей концентрации принимали наименьшую концентрацию, при которой исследуемое вещество полностью подавляло рост бактерий.

## 2.10 Тест на цитотоксичность

Анализ цитотоксичности был основан на клеточных линиях человека, стабильно экспрессирующих флуоресцентные белки eGFP, tdTomato, mCherry или Katushka2S. Для определения роста клеток и флуоресценции использовали 96-луночные (4000 клеток в 1 лунке) или 384-луночные (1000 клеток) планшеты с исследуемым веществом в трех повторностях. Показания снимали на сканере флуоресценции TYPHOON FLA950 (GE Healthcare) с высоким разрешением. Для детекции eGFP использовали лазер 473 нм и эмиссионный фильтр 520–540 нм. Фильтр 560–580 нм и лазер 532 нм использовали для mCherry и tdTomato, а лазер 635 нм и фильтр  $\geq 665$  нм для Katushka2S. Степень флуоресценции зависела от количества живых клеток, в которых происходит синтез белков. Процент живых клеток вычисляли относительно положительного контроля раствора диметилсульфоксида, за вычетом фонового сигнала. Обработка полученных изображений проводилась с использованием редактора ImageJ [146, 147].

## 2.11 Трансляция в бесклеточной системе

### 2.11.1 Система на основе набора «E. coli S30 Extract System for Linear Templates» (Promega, США)

Способность исследуемого вещества подавлять трансляцию исследовали при помощи набора «E. coli S30 Extract System for Linear Templates» (Promega, США).

Реакцию ставили в суммарном объеме 5 мкл следующего состава:

1. 2 мкл *S30 Premix*,
2. 1,5 мкл S30 клеточного экстракта *E. coli*,
3. 0,5 мкл смеси аминокислот 1мМ,
4. 0,5 мкл мРНК (Fluc 200ng),
5. 0,2 мМ D-люциферина,
6. 0,1 мкл ингибитора РНКаз Ribolock
7. 0,5 мкл тестируемого соединения.

Реакционную смесь за исключением мРНК предварительно смешивали на льду, далее инкубировали 5 минут при комнатной температуре, чтобы антибиотик успел связаться с рибосомой до сборки инициаторного комплекса, после чего смесь возвращали на лед и добавляли матрицу.

Трансляцию проводили в течение 20 минут при 37°C. Далее производили детекцию сигнала при помощи планшетного ридера Victor X5 2030 (Perkin Elmer, США).

### *2.11.2 Система на основе набора PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США)*

Способность исследуемого вещества подавлять трансляцию исследовали при помощи набора PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США).

Реакцию ставили в суммарном объеме 5 мкл следующего состава:

1. 2 мкл раствора А,
2. 1,5 мкл раствора В,
3. 0,5 мкл мРНК (Fluc, 200 нг),
4. 0,1 мкл (2000 М) D-люциферина,
5. 0,1 мкл ингибитора РНКаз Ribolock,
6. 0,3 мкл воды mQ
7. 0,5 мкл тестируемого соединения.

Реакционную смесь за исключением мРНК предварительно смешивали на льду, далее инкубировали 5 минут при комнатной температуре, чтобы антибиотик успел связаться с рибосомой до сборки инициаторного комплекса, после чего смесь возвращали на лед и добавляли матрицу.

Трансляцию проводили в течение 20 минут при 37°C. Далее производили детекцию сигнала при помощи планшетного ридера Victor X5 2030 (Perkin Elmer, США).

### 2.11.3 Система на основе набора Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease-Treated (Promega, США)

Способность исследуемого вещества подавлять трансляцию в эукариотической системе исследовали при помощи набора Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease-Treated (Promega, США).

Реакцию ставили в суммарном объеме 5,2 мкл следующего состава:

1. 3,5 мкл лизата,
2. 0,5 мкл смеси аминокислот 1мМ,
3. 0,5 мкл мРНК (euFluc, 200 нг),
4. 0,1 мкл (2000 М) D-люциферина,
5. 0,1 мкл ингибитора РНКаз Ribolock,
6. 0,5 мкл тестируемого соединения.

Реакционную смесь за исключением мРНК предварительно смешивали на льду, далее инкубировали 5 минут при комнатной температуре, чтобы антибиотик успел связаться с рибосомой до сборки инициаторного комплекса, после чего смесь возвращали на лед и добавляли матрицу.

Трансляцию проводили в течение 60 минут при 37°C. Далее производили детекцию сигнала при помощи планшетного ридера Victor X5 2030 (Perkin Elmer, США).

## 2.12 Тоупринтинг анализ

Тоупринтинг проводили по протоколу, описанному Орелле с соавторами [148]. Краткое описание процедуры изложено ниже.

На первом этапе осуществляли кинирование праймеров с добавлением радиоактивной метки  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P] АТФ с помощью полинуклеотид киназы (ThermoFisher, США) по протоколу, указанному производителем. Далее проводили *in vitro* трансляцию короткой модельной мРНК с использованием набора PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США). Реакция объемом 5 мкл содержала: 2 мкл раствора А, 1 мкл раствора В, 0,2 мкл Ribolock, 0,5 мкл исследуемого соединения, 0,5 мкл ДНК-матрицы

(0,2 ммоль / мкл), 0,5 мкл кинированного радиоактивной меткой праймера. Реакцию инкубировали 20 минут при 37°C. После инкубации в реакцию добавляли 1 мкл смеси для обратной транскрипции из набора Titan One Tube RT-PCR System (Roche, Швейцария). Обратную транскрипцию проводили в течение 15 минут при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10М NaOH с последующей инкубацией в течение 15 мин при 37°C. Нейтрализацию проводили добавлением 1 мкл 10N HCl с добавлением 200мкл буфера для ресуспендирования.

Очистку полученных образцов проводили с помощью набора QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Германия)

Для приготовления сиквенсных реакций использовали набор USB® Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Affymetrix, США) согласно инструкции производителя.

Электрофорез проводили в 6%-ном полиакриламидном геле (60×40×0,03 см), содержащем 19% (m/V) акриламида, 1% (m/V) N,N'-метиленбисакриламида и 7 М мочевины, в TBE-буфере в течение 2-3 часов. Образцы и продукты сиквенсных реакций наносили на гель по 2 и 1,5 мкл, соответственно.

Гель переносили на 3 мм бумагу, просушивали и экспонировали 18 ч с сенсорным экраном. Экран сканировали на приборе Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager (GE Healthcare, США).

Получение матриц для данного эксперимента производилось при помощи ПЦР амплификации с использованием набора Taq DNA Polymerase (ThermoFisher) по стандартному протоколу. Используемые матрицы представлены в Таб. 3.

Таб. 3. Используемые в тоупринтах матрицы.

Название	Последовательность мРНК
OsmC	5'- AUUAAUACGACUCACUAUAGGGAUAUAAGGAGGAAAAC AUAUGACAAUCCAUAAGAAAGGUCAGGCACACUGGGAA

Название	Последовательность мРНК
	GGCGAUUAUCAAACGCGGGGAAGGGAACAGUAUCCACCGA GAGUGGCGUGCUGAACCAACAGCCGUAUGGAUUUAACA CGCGUUUUGAAGGCGAAAAAGGAACCAACCCUGAAGAA CUGAUUGGCGCAGCGCAUGCCGCAUGUUUCUCAAUGGC GCUUUCAUUA AUGCUGGGGGAAGCGGGAUUCACGCCAA CAUCGAUUGAUACCACCGCCGAUGUGUCGUGGAUAAA GUGGAUGCCGGUUUUGCGAUUACGAAAUCGCACUGAA GAGUGAAGUUGCGGUGCCGGGUAUUGAUGCCUCUACCU UUGACGGCAUAAUCCAGAAAGCAAAAGCAGGAUGCCCG GUCUCUCAGGUACUGAAAGCGGAAAUUACGCUGGAUUA CCAGUUGAAAUCGUAA-3'
ErmBL	5'- UAAUACGACUCACUAUAGGGGCUUAAGUAUAAGGAGGAA AAAUAUGUUGGUAUUCCAA AUGCGUAAUGUAGAUAAA ACAUCUACUAUUUUGAAUAAGUGAUAGAAUUCUAUCG UUAAUAAGCAAAAUUCAUUAUAACC-3'
ErmCL	5'- UAAUACGACUCACUAUAGGGGAGUUUUUAUAAGGAGGAAA AAAUAUGGGCAUUUUUAGUAUUUUUGUAAUCAGCACAG UUCAUUAUCAACCAAACAAAAAAUAAAGUUUUUAUAAGG AGGAAAAAAUAUGGGCAUUUUUAGUAUUUUUGUAAUCA GCACAGUUCAUUAUCAACCAAACAAAAAAUAA-3'
ErmDL	5'- UAAUACGACUCACUAUAGGGGAGUUUUUAUAAGGAGGAAA AAAUAUGACACACUCA AUGAGACUUAAGUCCCAACUU UGAACCCAGUAAUAAUAAAAAAAGUGAUAGAAUUCU AUCGUAAUAAGCAAAAUUCAUUAUAACC-3'
RST-1	5'- UAAUACGACUCACUAUAGGGGCUUAAGUAUAAGGAGGAA

Название	Последовательность мРНК
	AACAUAUGUAUUGGACCUCAGUACUGCGUCAGCCGAAU AUGAAAUAUCCAUGGCUUCGAAGACUGCGCCUAAUAAUA AUAAAAAAGUGAUAGAAUUCUAUCGUUAAUAAGCAAA AUUCAUUAUAACC-3'
RST-2	5'- UAAUACGACUCACUAUAGGGCUUAAGUAUAAGGAGGAA AACAUAUGAAAUUCGCCAUCACCCUGCGUCAGUGCGAA GGCUGGUCACCGGUACAUUAUGACAAUUAUAAUAAUA AAAAAAGUGAUAGAAUUCUAUCGUUAAUAAGCAAAAUU CAUUAUAACC-3'
TrpL2Ala	5'- UAAUACGACUCACUAUAGGGCUUAAGUAUAAGGAGGAA AACAUAUGAAAGCAAUUUUCGUACUGAAAGGUGCGGCG CGCACUUCUGA-3'



### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1 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. Для работы на этой станции использовался редактор и интерпретатор языка программирования MultiPROBE II WinPREP Protocol Script, программа WinPREP. На первом этапе вещества растворяли в ДМСО до концентрации 20 мг/мл. После этого вещества переносились роботизированной станцией на чашки Петри, засеянные клетками *E. coli*  $\Delta tolC$  или *lptD*. Для удобства на этом этапе использовались чашки с размером грани 125мм, на такую чашку вмещается ровно один 96-луночный планшет с веществами. Далее чашки клетки выращивались и производился анализ активности полученных соединений (Рис. 25).



Рис. 25. 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* (Рис. 26).

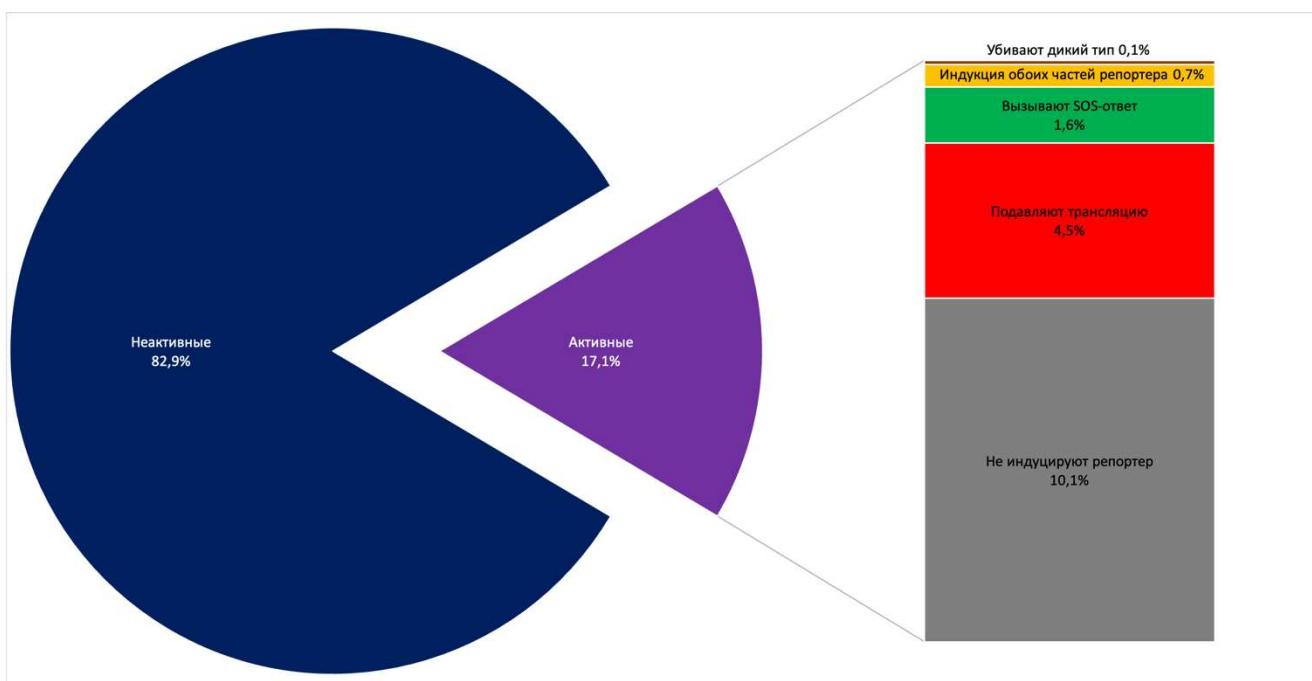


Рис. 26. Активность протестированных в ходе поиска соединений.

### 3.1.1 Новый ингибитор производное имидазола

В ходе высокопроизводительного поиска в библиотеках химических соединений, предоставленных компанией InterBioScreen Ltd, среди веществ, проявляющих антибиотическую активность, найдена молекула, не только подавляющая рост штамма *E. coli* JW5503  $\Delta tolC$ , трансформированного плазмидой pDualrep2, но и индуцирующая экспрессию гена *Katushka2S*, свойственную трансляционным ингибиторам (Рис. 27, В).

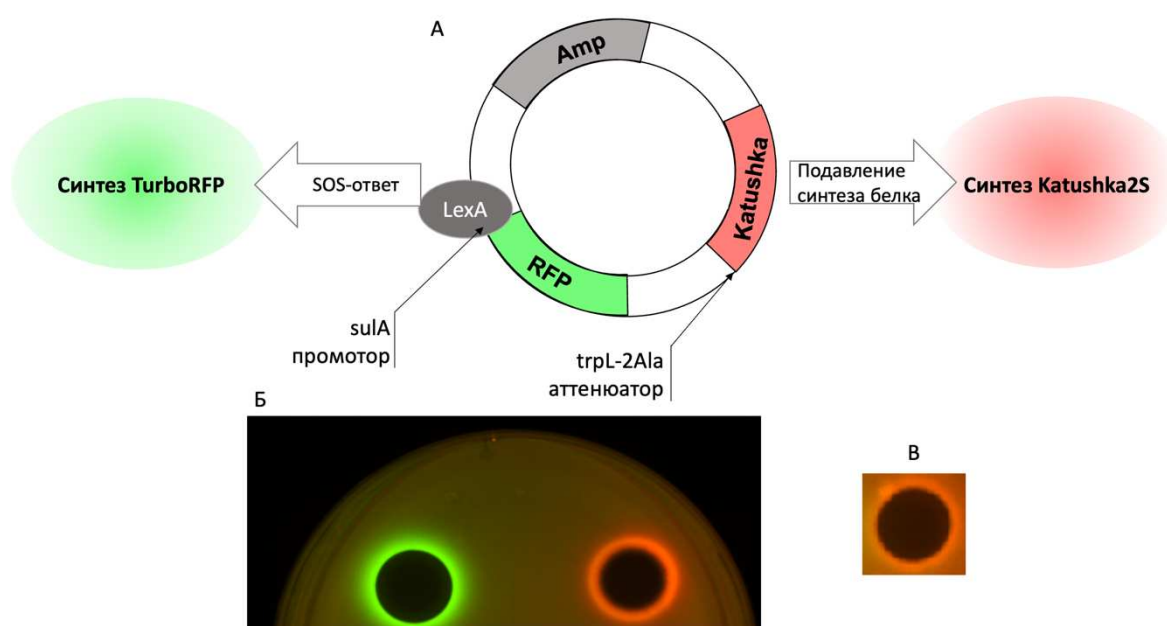


Рис. 27. А – строение репортерной плазмиды pDualrep2. Б – индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам трансляции или веществам, повреждающим ДНК. Капли эритромицина (справа, 2 мкг), левофлоксацина (слева, 0.05 мкг) наносили на поверхность чашки с агаром, содержащей клетки *E. coli* JW5503, трансформированные плазмидой pDualrep2. Экспрессия *Katushka2S* (красный) запускается ингибиторами трансляции, а экспрессия TurboRFP (зеленый) индуцируется при повреждении ДНК. В – индукция двойной репортерной системы репомисином (30 мкг)

Для удобства данная молекула была названа репомизином, формула данной молекулы– 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида, представлена на Рис. 28, А (STOCK4S-33513). При этом в ходе поиска были проверены два аналога данной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид (STOCK4S-37310, Рис. 28, Б) и 1-(2-((2-метоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид (STOCK4S-72264, Рис. 28, В). Эти молекулы не давали зон ингибирования роста штамма *E. coli* JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, в тесте на твердой агаризованной среде, поэтому дальнейшие эксперименты проводили только с репомизином.

В тесте на штамме *E. coli* BW25113, трансформированном репортерной плазмидой, данная молекула активности не проявила.

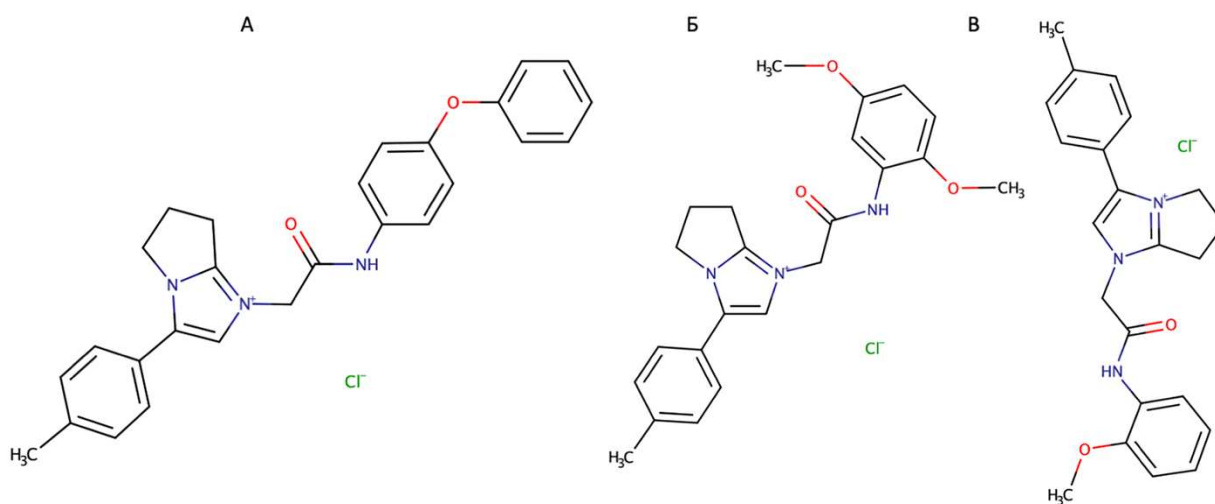


Рис. 28. А – структурная формула репомизина - 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513). Б – структурная формула аналога активной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-

37310). *B* – структурная формула аналога активной молекулы 1-(2-((2-метоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-72264)

#### *3.1.1.1 Сводная характеристика веществ, структурно похожих на репомидин*

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% [149]. Однако среди 79 найденных молекул ни одна не проверялась на биологическую активность против клеток бактерий.

#### *3.1.1.2 Измерение минимальной ингибирующей концентрации*

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом последовательных разведений на штамме *E. coli JW5503* с делецией гена *tolC* [80]. Минимальная ингибирующая концентрация репомидина составила 3.1 мкг/мл. Это сопоставимо с ингибирующей концентрацией такого природного ингибитора синтеза белка, как эритромицин, минимальная ингибирующая концентрация которого на данном штамме составила 3.1 мкг/мл.

#### *3.1.1.3 Измерение цитотоксичности на эукариотических клетках*

Токсичность данного соединения была проверена на нескольких культурах клеток человека в МТТ-тесте. К сожалению, для клеток человека это соединение оказалось более токсичным, чем для бактериальных клеток, что делает его непригодным (в данной форме) для использования в качестве лекарственного средства (Таб. 4).

Таб. 4. Данные МТТ-теста для репомидина

Клеточная линия	Концентрация*, мкг/мл
HEK293T	0.2 ± 0.1
MCF7	1.8 ± 0.5
A549	0.5 ± 0.1
Va-13	0.4 ± 0.2

\*Концентрация, в которой исследуемая молекула токсична для клеток, мкг/мл.

#### 3.1.1.4 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. Данные для репомидина (STOCK4S-33513) приведены на Рис. 29.

Исходя из полученных результатов можно констатировать, что молекула репомидина (STOCK4S-33513) является ингибитором трансляции.

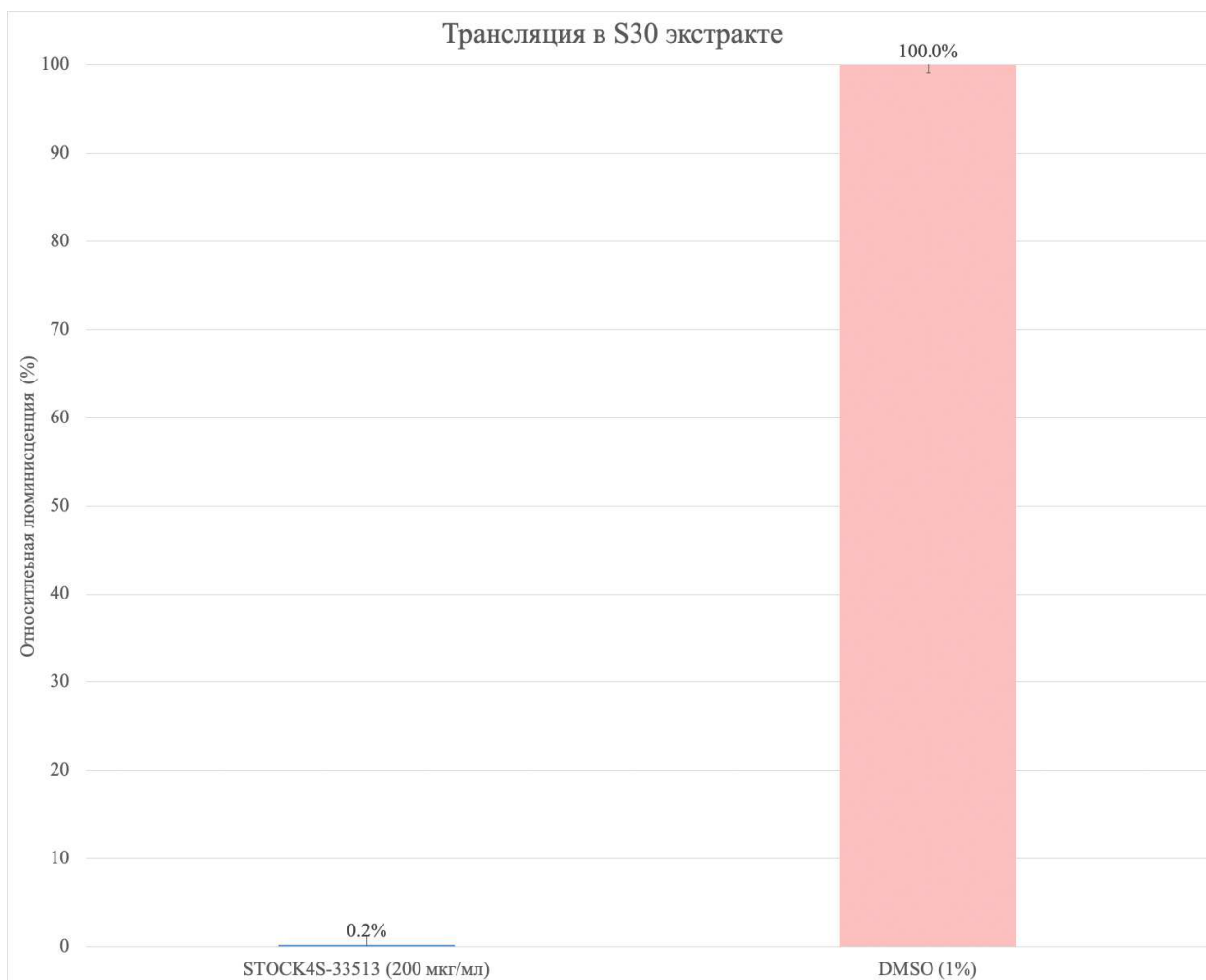


Рис. 29. Трансляция в бесклеточной системе на основе лизата *E. coli* (Promega) с добавлением репомидина (STOCK4S-33513), взятого в концентрации 200 мкг/мл. За 100% взят сигнал от люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе, без добавления ингибиторов трансляции

### 3.1.1.5 Анализ места остановки рибосом

Метод тоупринтинга позволяет не только подтвердить, является ли соединение ингибитором синтеза белка, 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. В типичном эксперименте мы также сравниваем места остановки рибосомы новыми и известными ингибиторами трансляции. Расстояние между первым нуклеотидом Р-сайта заблокированной на мРНК рибосомы и последним синтезированным нуклеотидом кДНК составляет 16 н. Для сравнения удобно использовать антибиотик тиострептон, который, как известно, останавливает рибосому на первом шаге трансляции в тот момент, когда в Р-сайте рибосомы находится стартовый кодон AUG. Исходя из этих данных мы провели расчет кодонов, которые были в Р-сайте на момент остановки рибосомы (Рис. 30). 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.



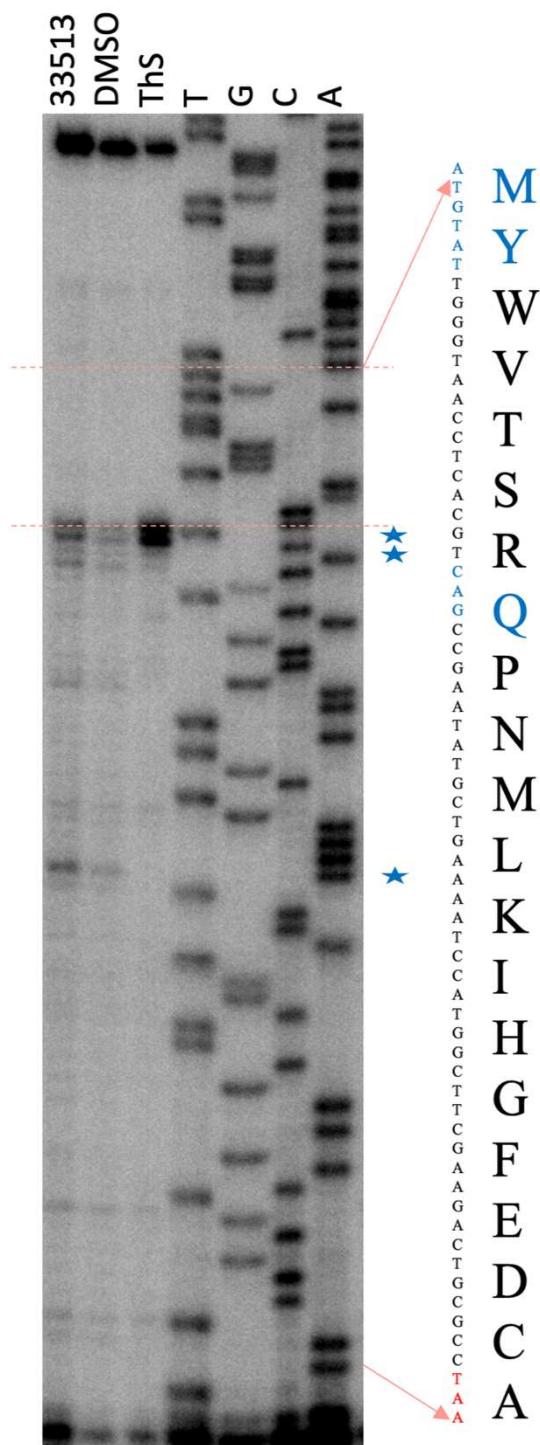


Рис. 30. Схема тоупринт-анализа на матрице RST1. 33513 – система трансляции с добавлением репомидина (STOCK4S-33513) в концентрации 200 мкг/мл. DMSO – отрицательный контроль (DMSO 1%); ThS – в систему трансляции добавлен контрольный антибиотик тиострептон в концентрации 50 мкМ (останавливает трансляцию на старт-кодоне [81]), T, G, A, C – секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах.

### **3.2 Вещества с антибактериальной активностью, найденные в природных источниках**

При поиске веществ среди природных образцов возникает сразу несколько сложностей по сравнению с поиском среди химических библиотек. Первая - низкое количество вещества в исходном образце, эта величина зависит от продуцента и условий его выращивания. Одно из преимуществ репортерной системы pDualrep2 заключается в возможности детектировать присутствие антибиотиков в количестве ниже ингибирующего, за счет детекции индукции сигнала одного из репортерных генов. Следующая трудность состоит в том, что в ходе теста природных соединений не известна молекула, обладающая активностью, и возникает необходимость разделения смеси и идентификации активного соединения. Для этого 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 (Рис. 31).

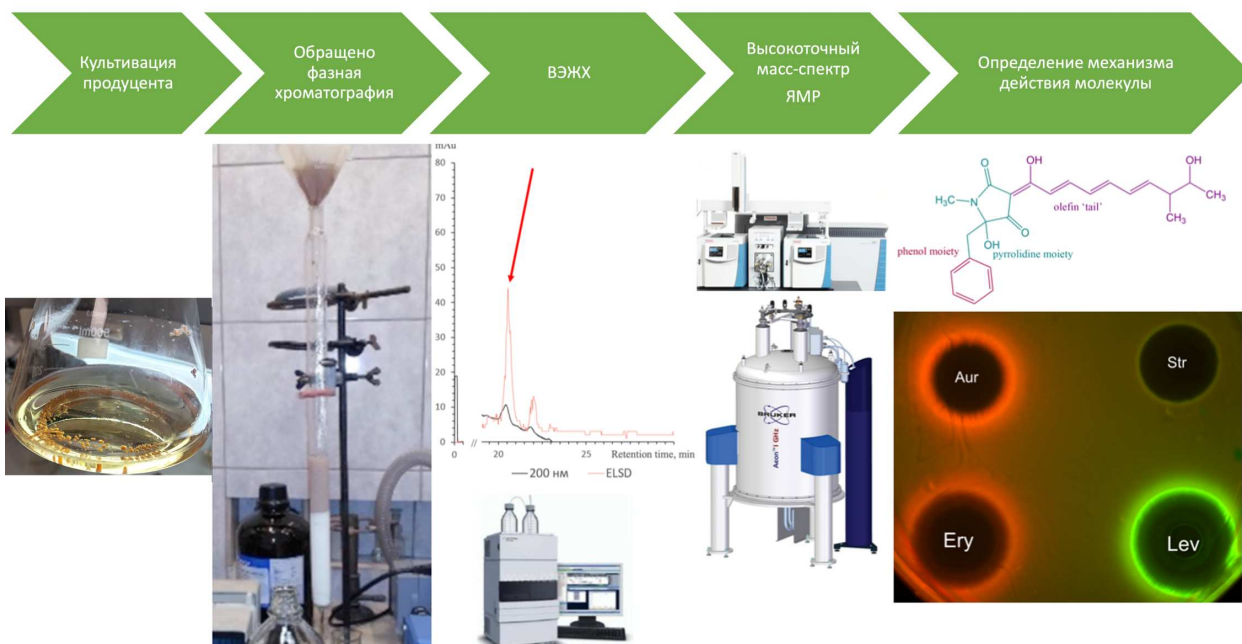


Рис. 31. Идентификация активного соединения из образцов природного происхождения.

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. Пять различных мангровых растений были использованы как источник актинобактерий, *Avicennia marina*, *Aegiceras corniculatum*, *Kandelia obovata*, *Bruguiera gymnorhiza* и *Thespesia populnea*, которые были собраны в Национальном природном заповеднике эстуария Бейлунь в Гуанси-Чжуанском автономном районе Китая. В общей сложности 101 штамм эндофитных актинобактерий был выделен. Они распространены в 7 порядках, 15 семействах и 28 родах, включая *Streptomyces*, *Curtobacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Nocardioides*, *Kineococcus*, *Kytococcus*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Agrococcus*, *Amnibacterium*, *Brachybacterium*, *Citricoccus*, *Dermacoccus*, *Glutamicibacter*, *Gordonia*, *Isoptericola*, *Janibacter*, *Leucobacter*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Pseudokineococcus*,

*Sanguibacter* и *Verrucosispora*. Среди них семь штаммов были потенциально новыми видами родов *Nocardioidea*, *Streptomyces*, *Amnibacterium*, *Marmoricola* и *Mycobacterium*. Прежде всего, штамм 8BXZ-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. В общей сложности 31 штамм показал положительные результаты как минимум в одном антибактериальном тесте. Примечательно, что штамм 8BXZ-J1 и три других потенциальных новых вида, 7BMP-1, 5BQP-J3 и 1BXZ-J1, проявляли антибактериальную биологическую активность. Так же было обнаружено, что штаммы *Streptomyces* 2BVP-J2 и 1BVP-1 продуцируют соединение, ингибирующее синтез белка. В то же время штамм *Streptomyces* 3BQP-1 продуцирует биоактивное соединение, вызывающее SOS-ответ в клетках бактерий (Рис. 32). Было показано, что мангровые растения содержат большое разнообразие культивируемых эндофитных актинобактерий, которые могут быть многообещающим источником для открытия новых видов и биологически активных соединений [150].

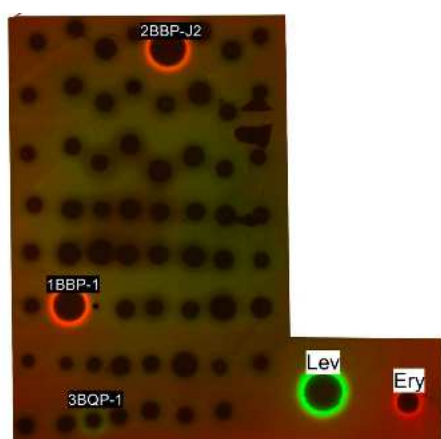


Рис. 32. Индукция двойной репортерной системы pDualrep2, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или веществам, вызывающим SOS-ответ. Капли эритромицина (ERY), левофлоксацина (LEV) и тестируемых соединений помещали на поверхность чашки с агаризованной средой, содержащей клетки *E. coli*  $\Delta$ tolC, 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. Доминирующим родом был *Streptomyces* (16,0 %), за ним следовали *Microbacterium* (14,5 %), *Agromyces* (14,3 %) и *Rhodococcus* (11,9 %). Другие 35 редких родов актинобактерий составляли меньшую долю. Примечательно, что 11 штаммов показали относительно низкое сходство последовательности гена 16S рРНК (<98,65 %) с достоверно описанными видами. 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 *pDualrep2*. 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 (Рис. 33), что еще раз подтверждает, что мангровые почвы являются резервуаром штаммов способных синтезировать потенциально полезные вторичные метаболиты [151].

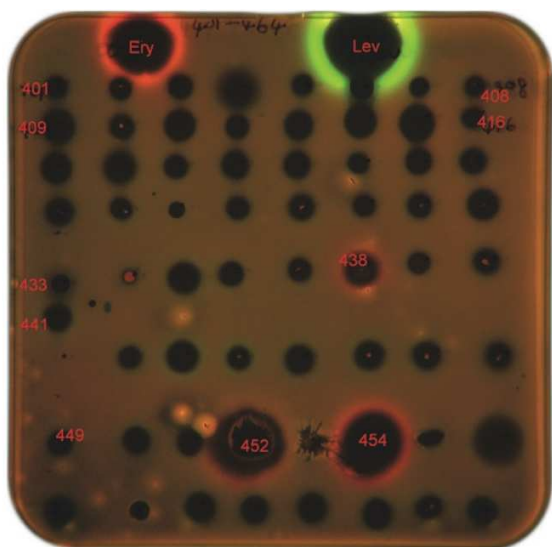


Рис. 33. Индукция двойной репортерной системы *pDualrep2*, чувствительной к ингибиторам синтеза белка или веществам, вызывающим SOS-ответ. Капли эритромицина (ERY), левофлоксацина (LEV) и тестируемых соединений помещали на поверхность чашки с агаризованой средой, содержащей клетки *E. coli*

$\Delta tolC$ , трансформированные репортерной плазмидой pDualrep2.

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 (Рис. 34). 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 pDualrep2 в концентрациях 1,9–5,9 нмоль (Рис. 35) [152].

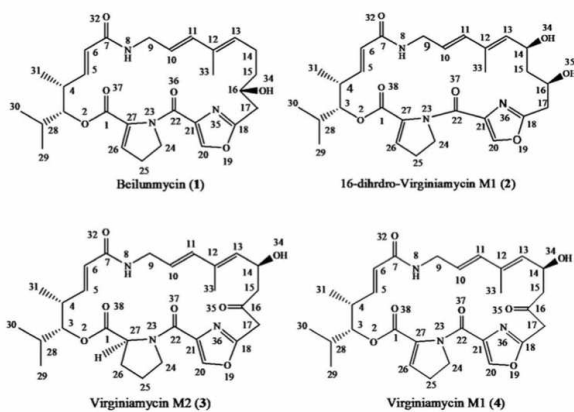


Рис. 34. Структуры соединений 1–4, выделенных из *Streptomyces* sp. 2BVP-J2.

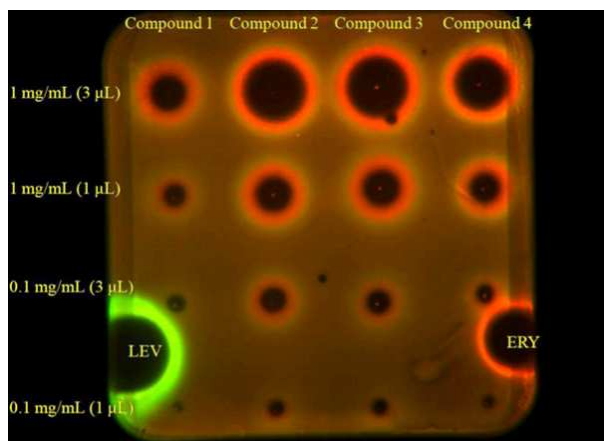


Рис. 35. Определение минимальных концентраций соединений 1–4, которые можно обнаружить с помощью pDualrep2. Капли по 3 мкл соединения 1 и 1 мкл соединений 2–4, протестированные в концентрации 1,0 мг/мл, показали индукцию

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. Филогенетический анализ, основанный на последовательностях генов 16S рибосомной РНК (рРНК), выявил значительный уровень разнообразия актинобактерий: 55 родов, распределенных в 27 семействах 12 порядков. Тридцать шесть штаммов показали относительно низкое сходство 16S рРНК (<98,65%) с достоверно описанными видами, среди которых четыре штамма уже были охарактеризованы как новые таксоны в наших предыдущих исследованиях. 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 (Рис. 36). Все соединения 8–11 проявляли антибактериальную активность, ингибируя синтез белка в системе рDualrep2 (Рис. 37). 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 [153].

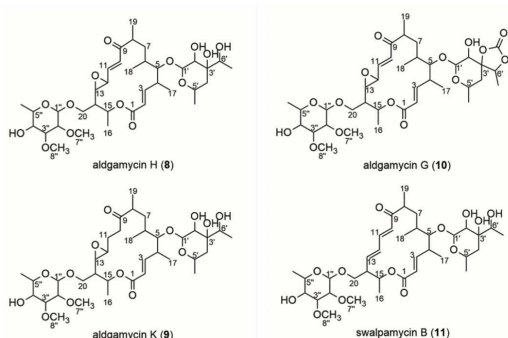


Рис. 36. Химическая структура соединений 8–11, выделенных из культуральной жидкости *Saccharothrix* sp. 16Сb2-4.

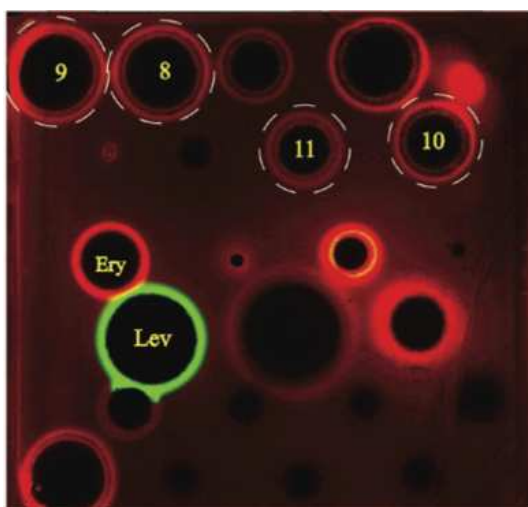


Рис. 37. Индукция двойной репортерной системы рDualrep2 ингибиторами синтеза белка или веществами, вызывающими SOS-Ответ. Капли эритромицина (Ery), левофлоксацина (Lev) и исследуемых образцов помещали на поверхность чашки с агаризованной средой, содержащей клетки *Escherichia coli* ΔtolC, трансформированные репортерной плазмидой рDualrep2.



### 3.2.1 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.

#### 3.2.1.1 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, а также был снят УФ-спектр (Рис. 38).

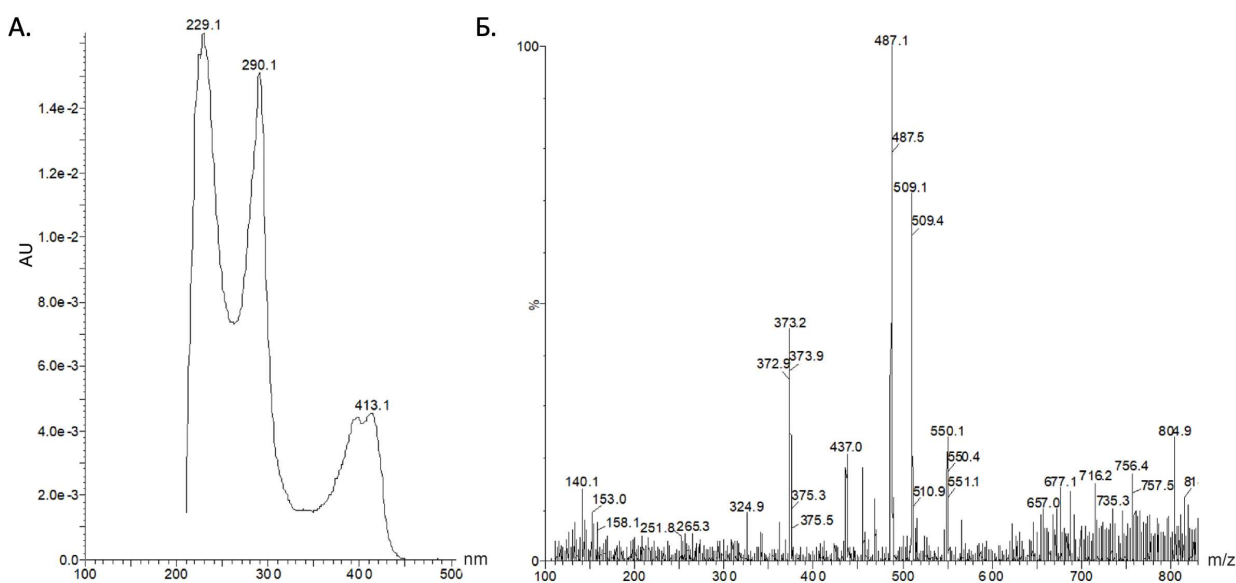


Рис. 38. А -УФ спектр тетраценомицина, Б – Масс-спектр тетраценомицина X

Кроме того, была проведена спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Совокупность полученных данных позволила сделать вывод, что активное соединение идентично Тетраценомицину X (ТсмX) (Рис. 39). Ранее подобное соединение было обнаружено в штамме *Streptomyces glaucescens* [9].

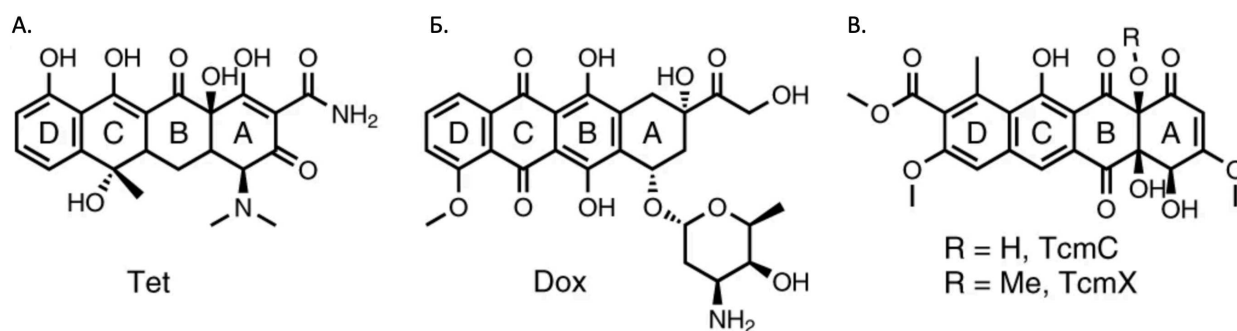


Рис. 39. Химические структуры тетраценомицина и сходных антибиотиков. Показаны А - Tet, Б - Dox, В - TcmC и TcmX.

Для подтверждения данной гипотезы, был секвенирован полный геном *Amycolatopsis* sp. A23 и доказано наличие кластера генов для биосинтеза TcmX. Обнаруженный кластер был аналогичен ранее идентифицированному кластеру TcmC, присутствующему в геноме *S. glaucescens* (Рис. 40).

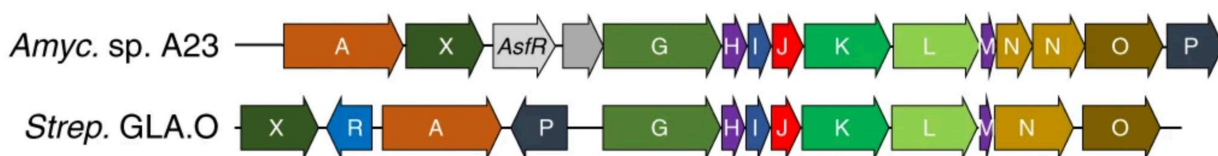


Рис. 40. Кластер биосинтеза тетраценомицина в *Amycolatopsis* sp. A23 и *S. glaucescens* GLA.O [154]. Ортологичные гены отмечены одинаковым цветом и подписаны аналогичными буквами.

Биоинформатический анализ показывает, что аналогичные кластеры генов присутствуют у штаммов *S. caatingaensis*, *A. rifamycinica* и *A. balhimycina*, что позволяет предположить, что эти виды также продуцируют Tcm. Кроме того, был идентифицирован второй меньший кластер паралогичных генов у *Amycolatopsis* sp. A23, сходный с аналогичным кластером *S. glaucescens* GLA.O, а также у ряда других видов *Streptomyces* и *Amycolatopsis*, не содержащих кластер генов Tcm. В совокупности, полученные биохимические и биоинформатические данные свидетельствуют о том, что активное соединение, продуцируемое *Amycolatopsis* sp. A23 — TcmX.

### 3.2.1.2 Исследование механизма действия Тетраценомицина X

Согласно данным литературы [98, 155, 156], механизм действия тетраценомицинов должен быть обусловлен нарушением метаболизма нуклеиновых кислот, аналогично антроциклиновым антибиотикам, таким как Доксорубин [157]. 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) (Рис. 41). 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

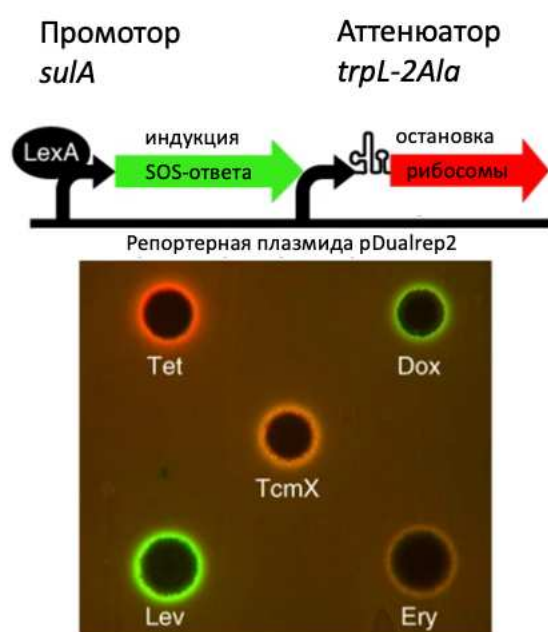


Рис. 41. Индукция двойной репортерной системы. Нанесены Tet (0.5 мкг), Dox (2 мкг), Ery (2 мкг), Lev, (0.05 мкг) и TcmX (2 мкг)

Чтобы подтвердить результаты анализа, полученные с использованием двойной репортерной системы, дополнительно также исследовали динамику включения радиоактивно меченого [ $^{14}\text{C}$ ]-валина в белки, и [ $^3\text{H}$ ]-тимидина в ДНК во время роста *E. coli* в присутствии возрастающих концентраций TcmX, Tet или Dox (Рис. 42). Результаты показали, что при концентрациях, в десять раз превышающих минимальную ингибирующую концентрацию, как TcmX, так и Tet приводили к резкому (80%) снижению синтеза белка, тогда как при той же концентрации Dox оказывал незначительное влияние (Рис. 42, А). Напротив, Dox был превосходным ингибитором синтеза ДНК, приводя к почти полному ингибированию включения [ $^3\text{H}$ ]-тимидина в ДНК при пятикратной МИК, тогда как TcmX практически не влиял на включение [ $^3\text{H}$ ]-тимидина даже при 30-кратной МИК. (Рис. 42, В).

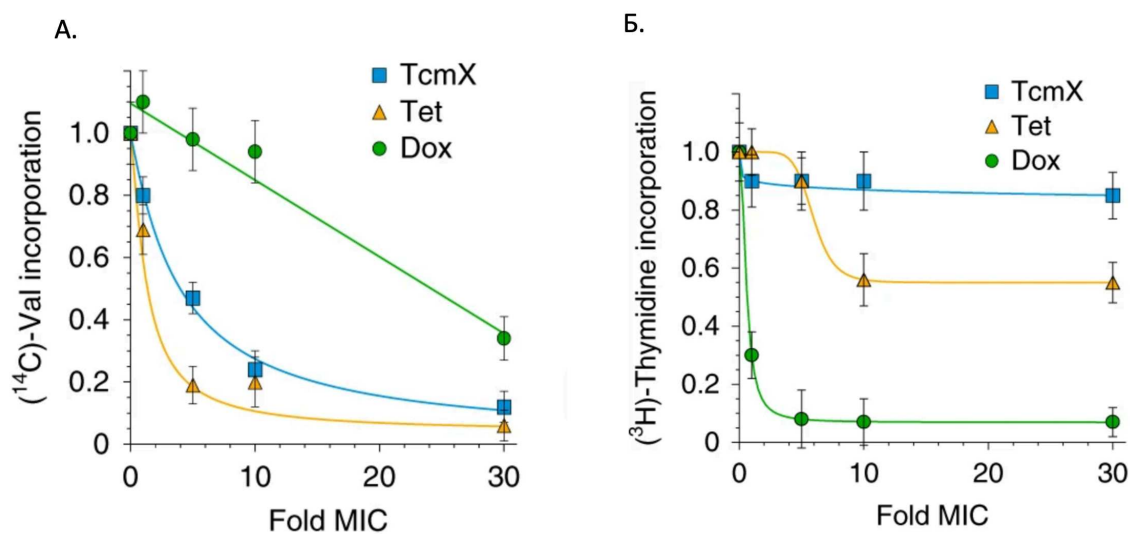


Рис. 42. А - Ингибирование биосинтеза белка с включением меченого валина [ $^{14}\text{C}$ ], использованного для детекции биосинтеза. TcmX, Dox и Tet были добавлены в соответствии с МИК, В - Ингибирование метаболизма нуклеиновых кислот добавлением TcmX, Dox и Tet детектированное посредством оценки включения меченого [ $^3\text{H}$ ]-тимидина.

Ингибирующий эффект (50%) Tet на включение тимидина наблюдался только при 10-кратной МИК, что, скорее всего косвенно связано с изменением

целостности мембраны [158]. Маловероятно, что Tet напрямую влияет на репликацию ДНК путем интеркаляции ДНК, поскольку SOS-ответа в нашей репортерной системе с Tet не обнаружено (Рис. 41).

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 (Рис. 43). 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 [98, 155, 156].

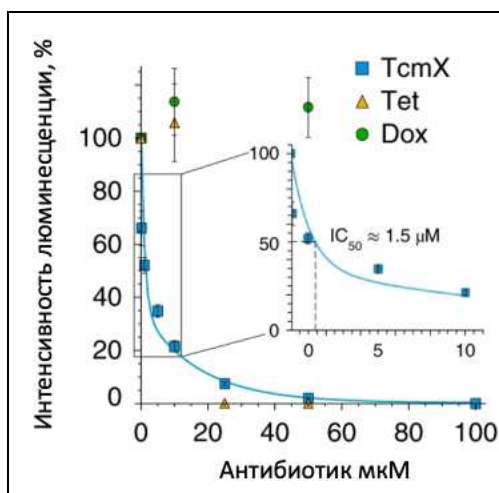


Рис. 43. Ингибирование синтеза белка возрастающими концентрациями TcmX (голубой), Tet (желтый) and Dox (зеленый) в *in vitro* бесклеточной системе трансляции

### 3.2.1.3 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. Штамм *E. coli* SQ110  $\Delta tolC$  в отличие от штаммов *E. coli* дикого типа, которые содержат семь оперонов рРНК, содержит только один оперон рРНК (*rrlE*), что значительно упрощает селекцию устойчивости к антибиотикам посредством мутаций рРНК [81]. Кроме того, в этом штамме отсутствует компонент

наружной мембраны TolC эффлюксных насосов, что позволяет использовать более низкие концентрации антибиотика (TcmX) во время процедуры селекции, о чем свидетельствует 32-кратное снижение ( $>64$  до 2 мкг\*мл<sup>-1</sup>) в МИК для TcmX (Таб. 5).

В результате отбора устойчивых клонов было получено несколько штаммов, демонстрирующих МИК в 8–16 раз выше, чем у штамма дикого типа (Таб. 5). 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. Затем полученными плазмидами трансформировали штамм SQ171  $\Delta tolC$ , в котором отсутствовали все семь оперонов рРНК, так что содержащиеся в плазмиде мутированные опероны *rrnB* служили единственным источником рибосом после потери рРНК дикого типа, содержащей плазмиду pCSacB.

Таб. 5. МИК для различных устойчивых мутантов

Штамм <i>E. coli</i>	МИК TcmX мкг/мл	МИК Ery мкг/мл
BW25113	>64	>64
BW25113 $\Delta tolC$	2	2
SQ110 $\Delta tolC$ WT	1	2
SQ110 $\Delta tolC$ U2586G	16	2
SQ110 $\Delta tolC$ U2586A	16	2
SQ110 $\Delta tolC$ U2609G	8	2
SQ171 $\Delta tolC$ WT	1	2
SQ171 $\Delta tolC$ U2586Ga	16	2

Штамм <i>E. coli</i>	МИК TcmX $\mu\text{г/мл}$	МИК Ery $\mu\text{г/мл}$
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U2586Aa	16	2
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U2586Ca	8	2
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U1782Cb	16	2
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U2609Ga	8	2
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U2609Aa	4	2
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U2609Ca	2	2
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ A2059Ga	1	>64
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ A2058Ga	1	>64
SQ171 $\Delta\text{tolC}$ U1782C/U2586Cb	4	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 также наблюдалась для замен U2609A и U2609C, кратное увеличение МИК было менее значительным (в 2–4 раза).

Кроме того, замены A2058G и A2059G, которые, согласно данным литературы [159], придавали высокий уровень устойчивости к Ery (> 64-кратный), не влияли на МИК в экспериментах TcmX.

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.

#### 3.2.1.4 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. Внутри сайта связывания плоские кольца C и D тетрациклического хромофора TcmX (Рис. 39 А) укладываются на основания нуклеотидов 23S рРНК U1782 и U2586, которые образуют друг с другом неканоническую пару оснований U–U (Рис. 44).

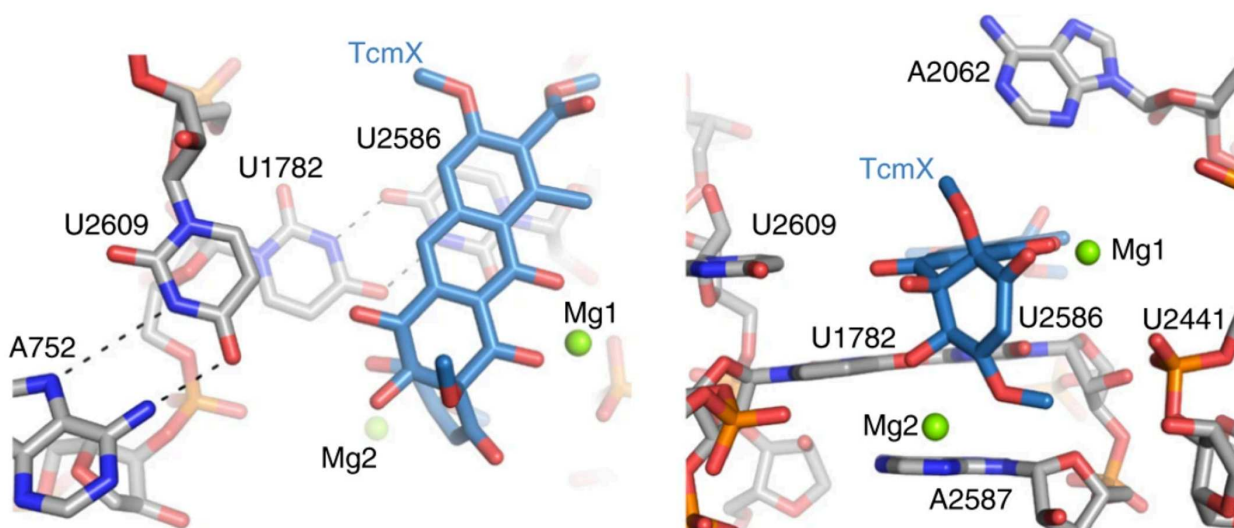


Рис. 44. Взаимодействие тетраценомицина X с рибосомой.

Поскольку U2609 образует пары оснований с A752 (Рис. 44), одним из возможных объяснений устойчивости к TcmX в этих случаях является то, что мутации U2609 нарушают спаривание оснований с A752, что, в свою очередь, может привести к конформации, изменяющей сайт связывания TcmX.

Помимо стэкинг-взаимодействий, большинство других контактов TcmX-рибосомы опосредуются двумя ионами, которые, как мы предполагаем, являются ионами магния (Mg) на основании присутствия и сходства координированных ионов Mg в структуре комплекса тетрациклина с рибосомой [160, 161]. Mg1 и Mg2 координируют взаимодействие TcmX с



фосфатно-кислородным остовом U2441, а также с рибозой и азотистым основанием A2587 соответственно. Хотя A2062 находится в непосредственной близости от TcmX, плотность этого основания плохо разрешена, что позволяет предположить, что оно не устанавливает стабильное взаимодействие.

### *3.2.1.5 Ингибирование трансляции на рибосомах человека*

Для TcmX было показано, что увеличение его концентрации в среде ведет к полной потере жизнеспособности клеток НЕК293Т (Рис. 45, А). Рассчитанная концентрация цитотоксичности, которая подавляет жизнеспособность 50% клеток (CC<sub>50</sub>) составила 2,5 мкМ, аналогично той (5,4–10,9 мкМ), о которой сообщалось ранее относительно других линий клеток человека [98, 155, 162-164]. Для сравнения, Dox проявлял гораздо более высокую цитотоксическую активность против клеток НЕК293Т с CC<sub>50</sub> 0,006 мкМ (6 нМ), что было более чем на два порядка ниже, чем для TcmX.

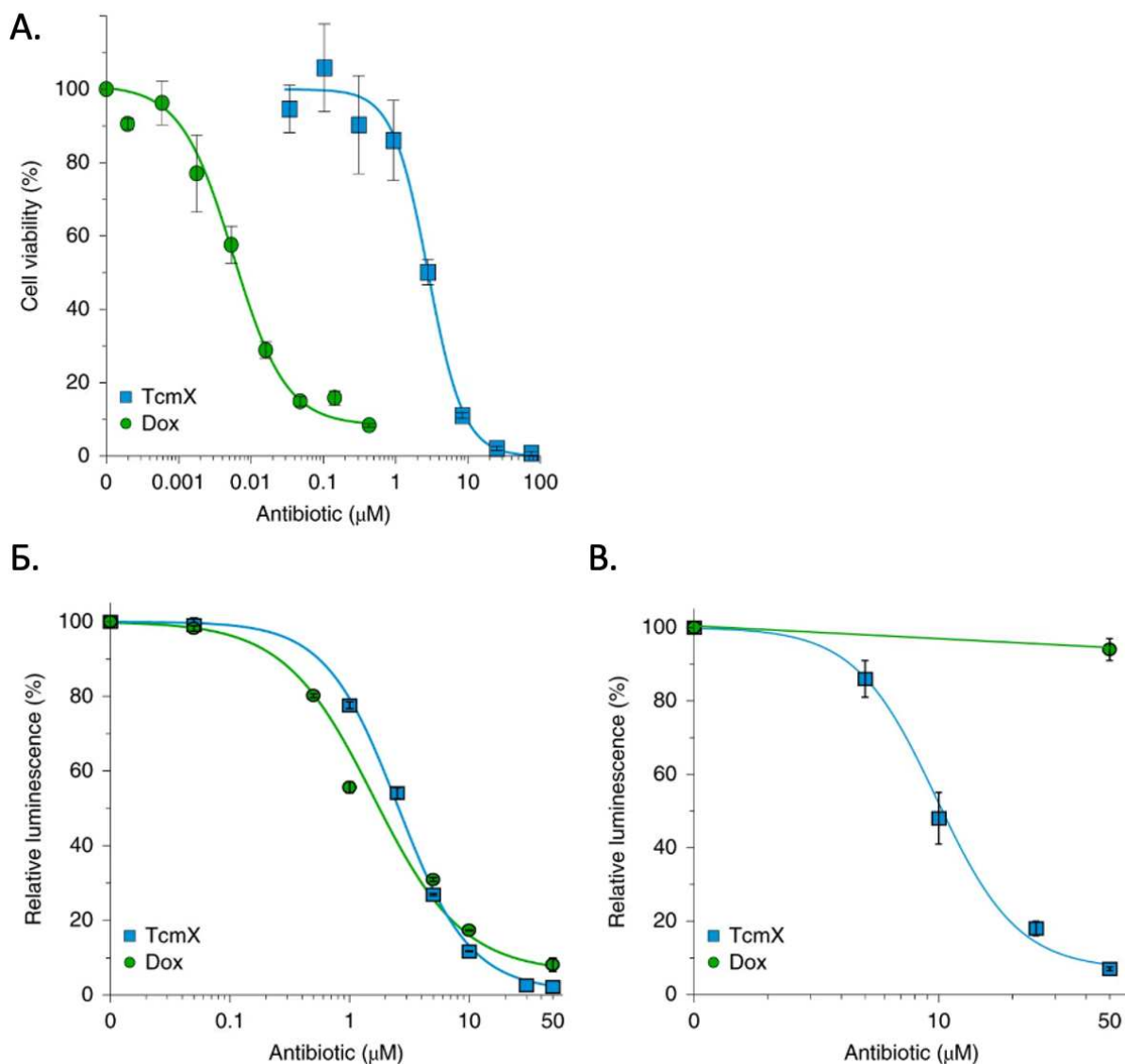


Рис. 45. А – жизнеспособность клеток в присутствии увеличивающихся концентраций TcmX и Dox, Б – *in vivo* трансляция в клетках НЕК293Т с репортерной конструкцией Fluc, В – *in vitro* трансляция в клеточном лизате НЕК293Т с репортерной конструкцией Fluc

После оценки цитотоксичности TcmX в отношении клеток НЕК293Т, была исследована способность TcmX ингибировать трансляцию (С.Е. Дмитриев, опубликованные данные) *in vivo* (Рис. 45, Б) и *in vitro* (Рис. 45, В).

Чтобы проверить ингибирование трансляции *in vivo*, клетки НЕК293Т были трансфицированы репортерной конструкцией Fluc. Далее клетки обрабатывали возрастающими концентрациями TcmX и контрольного Dox и

отслеживали люминесценцию Fluc [165] (Рис. 45, В). ТсмХ ингибировал люминесценцию Fluc с  $IC_{50}$  2,5 мкМ (Рис. 45, В), что сравнимо с  $CC_{50}$ , наблюдаемой для цитотоксичности, которая также составляла 2,5 мкМ (Рис. 45, А). Идентичные значения  $CC_{50}$  и  $IC_{50}$  позволяют предположить, что цитотоксичность, вызываемая ТсмХ на клетках НЕК293Т, вероятно, связана с прямым ингибированием трансляции. Напротив, Дох ингибировал люминесценцию Fluc с  $IC_{50}$  (1,5 мкМ), которая была в 250 раз выше, чем  $CC_{50}$ , наблюдаемая для цитотоксичности (Рис. 45, А), что, таким образом, вероятно, отражает косвенное влияние Дох на трансляцию, через ингибирование ДНК репликации и транскрипции в клетках.

Чтобы подтвердить, что ТсмХ может напрямую ингибировать трансляцию на 80S рибосомах человека, были приготовлены экстракты цельных клеток из культивируемых клеток НЕК293Т. Трансляцию в бесклеточной системе также отслеживали, измеряя люминесценцию Fluc [166] в присутствии возрастающих концентраций ТсмХ (Рис. 45, С). Используя эту систему трансляции *in vitro*, для ТсмХ было показано дозозависимое ингибирование трансляции Fluc с  $IC_{50}$  10 мкМ. Это значение находится в диапазоне, аналогичном диапазону, наблюдаемому для цитотоксичности и ингибирования трансляции *in vivo*. Тем не менее, полученные данные не позволяют полностью исключить возможность того, что ТсмХ также имеет другую мишень в клетке млекопитающих, что может объяснить небольшие различия в значениях  $IC_{50}$  *in vitro* и *in vivo*. В отличие от ТсмХ, Дох не ингибировал трансляцию Fluc *in vitro* даже при самой высокой протестированной концентрации (50 мкМ) (Рис. 45, С).

### 3.2.1.6 Исследование влияния TcmX на элонгацию трансляции

Чтобы установить механизм действия TcmX во время трансляции, был проведен тоупринт анализ (toeprinting assay), позволяющий отследить положение рибосомы на мРНК *trpL-2Ala* с использованием обратной транскрипции (Рис. 46, 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 [161, 167]. 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 [168].

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* (Рис. 46, В). Как отмечалось ранее, Ery индуцирует

остановку трансляции ErmBL, в то время как десятый (Asp, D) кодон, располагается в Р-сайте [169, 170]. Когда TcmX также останавливал трансляцию на матрице ErmBL, остановка рибосомы наблюдалась не на десятом кодоне, а скорее на 16-м (Leu, L) кодоне (Рис. 46, В). Исходя из полученных данных можно предположить, что аналогично макролидам остановка трансляции, опосредованная TcmX, тоже 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 (Рис. 46, А,В), аналогично механизму действия макролидов, таких как Ery [168], что согласуется с положением TcmX в туннеле рибосомы (Рис. 46,С). TcmX не перекрывается с тРНК А- или Р-сайта (Рис. 46, D), а располагается глубже внутри выходного туннеля, аналогично Ery (Рис. 46,Е), где он может мешать удлинению формирующихся полипептидных цепей (Рис. 46,Е). 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 (Рис. 46, G)

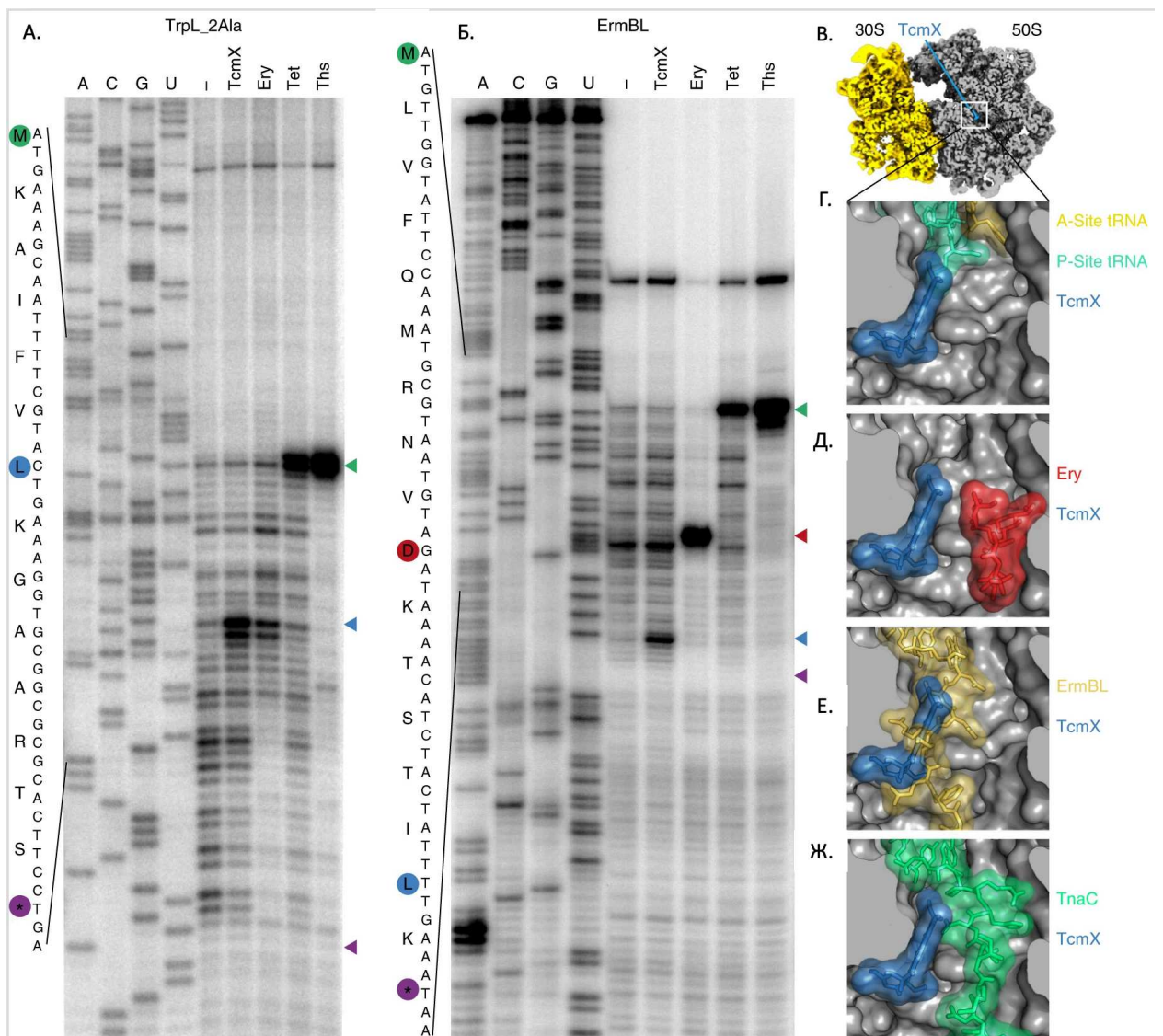


Рис. 46. А, Б - Тоупринтинг с матрицами TrpL-2Ala (А) и ErmBL (Б) в присутствии или отсутствии TcmX и контрольных антибиотиков Ery, Tet и Ths. Ths и Tet ингибируют инициацию (зеленая стрелка), в то время как TcmX и Ery приводят к остановкам в ходе элонгации на седьмом кодоне для матрицы TrpL\_2Ala (А) 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-Eco70S, 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 [98, 155, 156]. Это предположение также подкреплялось сходством тетраценомицинов с Dox (Рис. 39), а также сообщением о том, что тетраценомицины не ингибируют *in vitro* синтез полифенилаалнина на поли(U) матрице [9].

Однако, в рамках данной работы было показано, что (1) TcmX не вызывает SOS-ответ из-за повреждения ДНК, как это наблюдается для Dox (Рис. 41), 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 [160], ингибирует синтез белка в бактериальной системе трансляции *in vitro* (Рис. 43), а также в лизатах клеток человека (Рис. 45). 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 (Таб. 5).

Тетрациклический хромофор TcmX укладывается на неканоническую пару оснований, образованную между U2586 и U1782. Стоит отметить, что продуценты тетраценомицинов, такие как *S. glaucescens* и *Amycolatopsis* sp. A23 также содержат пару оснований U-U, что позволяет предположить, что их рибосомы должны быть чувствительны к антибиотикам, которые они продуцируют. У этих организмов резистентность обеспечивается наличием индуцируемого гена *tcmA*, который кодирует переносчик метаболитов TcmA, ответственный за откачку TcmC из клетки [171]. В соответствии с сохранением пары оснований U-U у всех эукариот, с помощью крио-ЭМ было

показано, что TcmX связывается с одним и тем же участком в выходном туннеле и ингибирует трансляцию на 80S рибосомах человека *in vivo* и *in vitro* (Рис. 45). Таким образом, было выдвинуто предположение, что ингибирование синтеза белка, а не интеркаляция с ДНК, является вероятной причиной наблюдаемой цитотоксичности тетраценомицинов, наблюдаемой для клеток НЕК293Т (Рис. 45) и описанной в отношении других клеточных линий человека [98, 155, 162-164].

По сравнению с макролидными антибиотиками, такими как Ery, сайт связывания TcmX находится на противоположной поверхности рибосомного туннеля (Рис. 46). Различные сайты связывания TcmX и Ery согласуются с выводами о том, что мутация A2058G в 23S рРНК придает устойчивость к эритромицину, но не к TcmX, тогда как мутации в U2586 или U1782, которые придают устойчивость к TcmX, не придают устойчивости к Ery (Таб. 5). Отсутствие перекрестной устойчивости к TcmX у A2058G важно, поскольку мутация или модификация (метилование) A2058 представляет собой одну из основных детерминант клинической устойчивости к антибиотикам макролидам, линкозамидам и стрептограмину В (MLSB) [168, 172]. Тем не менее, механизм действия TcmX, по-видимому, напоминает механизм действия макролидов в отношении остановки трансляции зарождающимся полипептид-зависимым образом [168]; однако специфичность остановки для TcmX, по-видимому, отличается.

Таким образом, в будущем было бы интересно проанализировать в масштабе всего транслятома, существует ли также специфичность последовательности ингибирования TcmX, и если да, то как эта специфичность соотносится с мотивами последовательности, идентифицированными для макролидных антибиотиков [168].

В совокупности можно сделать вывод о том, что способ связывания и механизм действия TcmX, а также отсутствие перекрестной резистентности с другими антибиотиками, вероятно, сохраняются для большинства, если не для всех, тетраценомицинов, что делает членов этого семейства потенциально



привлекательными. соединениями для будущей разработки новых противомикробных агентов.

В дальнейшей работе был выделен еще один представитель тетраценомицинов - 6-гидрокситетраценомицина X (6-ОН-ТсмX, Рис. 47). В отличие от ТсмX, 6-ОН-ТсмX проявлял более низкую противомикробную и цитотоксическую активность, но сопоставимую способность ингибировать синтез белка *in vitro*. Обзор спектральных свойств тетраценомицинов показал глубокие различия как в УФ-поглощении, так и в спектрах флуоресценции ТсмX и 6-ОН-ТсмX, что свидетельствует о значительном влиянии 6-гидроксилирования на хромофор тетраценомицина. Тем не менее характерные спектральные свойства тетраценомицинов делают их подходящими кандидатами в качестве основы для разработки полусинтетических лекарств [173].

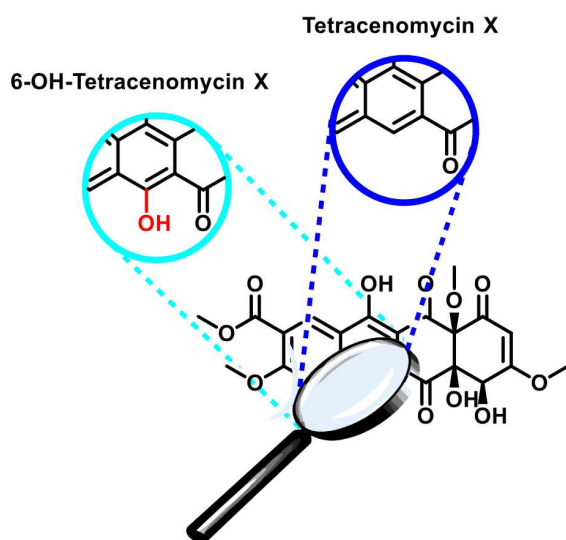


Рис. 47. Сравнение структур тетраценомицина X и 6-гидрокситетраценомицина X.

### 3.2.2 Аурапланин – новый ингибитор трансляции

#### 3.2.2.1 Установление структуры активной молекулы

Первичный поиск культуральной жидкости, проявляющей антибактериальную активность, проводился среди штаммов из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов при помощи репортерной системы pDualrep2 [70]. Активность проявила культуральная жидкость штамма *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862.

Род *Actinoplanes* принадлежит к семейству *Micromonosporaceae* филума *Actinobacteria* [174]. По данным анализа последовательности 16S рРНК, наиболее сходными с *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862 являются *Actinoplanes rectilineatus* и *Actinoplanes liguriensis* (данные не приведены), однако в ходе анализа данных полногеномного секвенирования наиболее похожие на последовательности ридов, принадлежали *Actinoplanes teichomyceticus* и *Actinoplanes* sp. SE50 (Таб. 6).

Таб. 6. Результаты выравнивания тысячи случайных ридов с помощью BLASTN к нуклеотидной базе NCBI nt. Последовательности в NCBI nt.

Вид	Количество ридов, которые были сильнее всего похожи на последовательности из этого вида
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	263
<i>Actinoplanes</i> sp. SE50	249
<i>Actinoplanes derwentensis</i>	47
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	42
<i>Actinoplanes</i> sp. OR16	42
<i>Actinoplanes friuliensis</i>	31
<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109	14
Другие	312

Исследования продуцента были проведены нашими коллегами из Института биохимии и физиологии микроорганизмов (ИБФМ), поэтому в данной работе мы остановимся на организме *Actinoplanes* только с точки зрения спектра антибиотиков, синтезируемых родственными видами. Одним из наиболее близких к *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862 видом, производящим антибиотики, является *Actinoplanes liguriensis*. Этот штамм синтезирует градимидин (Рис. 48, А) – бактериоцин, который препятствует биосинтезу клеточной стенки [175]. Другой близкородственный штамм *Actinoplanes teichomyceticus* является продуцентом тейкопланина А2 [176] (Рис. 48, Б). Тейкопланина А2, так же, как и градимидин, влияет на синтез клеточной стенки.

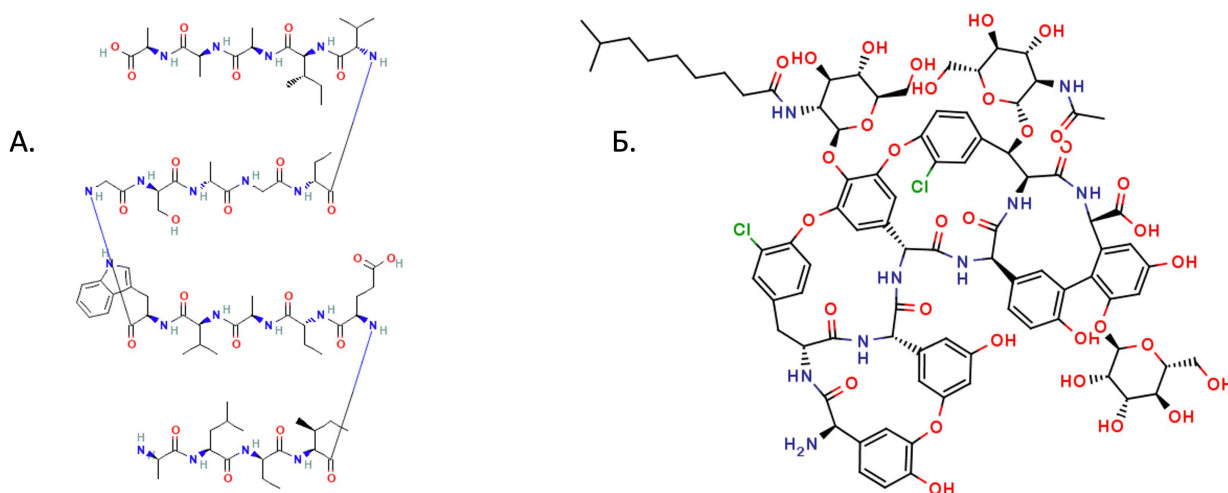


Рис. 48. Формулы антибиотиков, продуцируемых штаммами рода *Actinoplanes*. А – градимидин, Б - тейкопланин А2.

Максимальная активность культуральной жидкости штамма *Actinoplanes* sp. VKM Ac-2862 проявляется на 7е сутки при культивации на 28°С при постоянном перемешивании на средах М9 и ПДС. При этом КЖ окрашена в тёмно-оранжевый цвет, а биомасса представляет собой оранжевые паллеты.

При первичной очистке на сорбенте LPS-500-Н, активность преимущественно присутствовала во фракции АСN50 (Рис. 49).

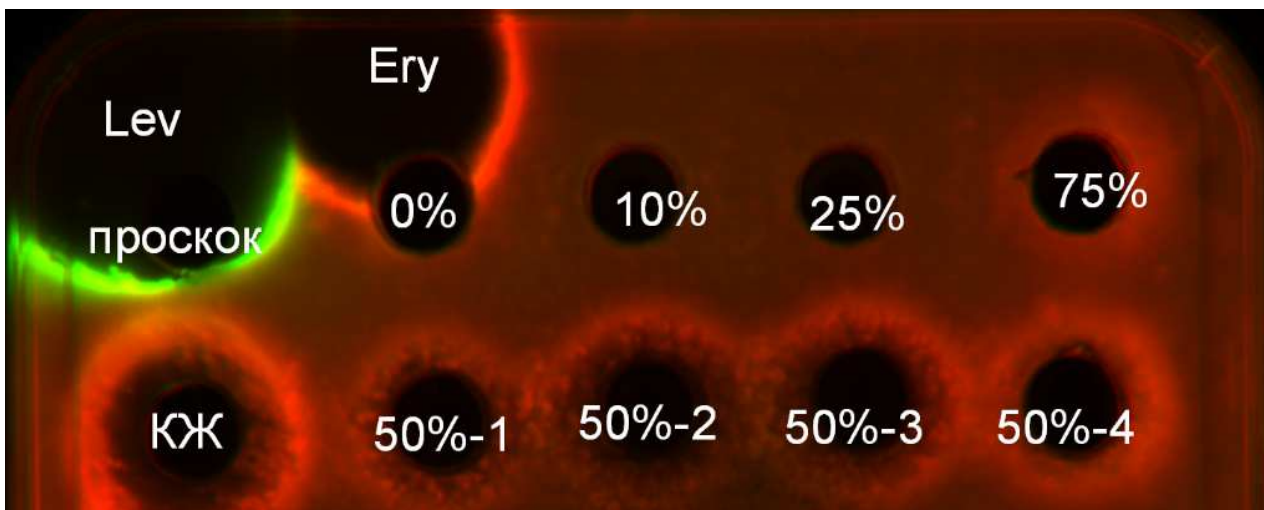


Рис. 49. Индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам трансляции или веществам, повреждающим ДНК. Капли эритромицина (Ery, 2 мкг), левофлоксацина (Lev, 0.05 мкг) наносили на поверхность чашки с агаром, содержащей клетки *E. coli* JW5503, трансформированные плазмидой pDualrep2. Экспрессия Katushka2S (красный) запускается ингибиторами трансляции, а экспрессия TurboRFP (зеленый) индуцируется при повреждении ДНК. Культуральную жидкость *Actinoplanes* sp. VKM Ас-2862 и проскок вносили по 100 мкл в лунку. Фракции были предварительно разбавлены в 10 раз и так же были внесены в лунку по 100 мкл.

При проведении ВЭЖХ активность была обнаружена в пике, детектированном при поглощении 400 нм. На профиле ВЭЖХ у целевого пика наблюдается плечо (Рис. 50).

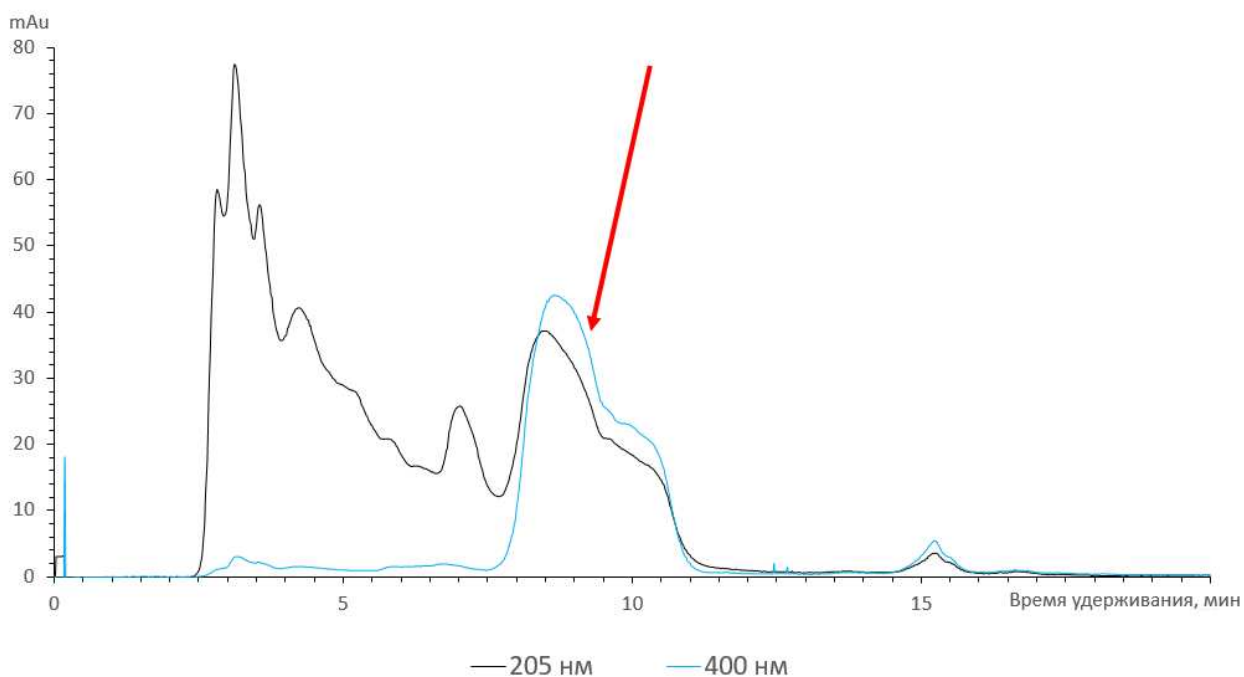


Рис. 50. Профиль препаративной ВЭЖХ образца 49252-ACN50. Параметры разделения приведены выше. Детекция УФ-поглощения на 205 (черная линия) и 400 (голубая линия) нм. Указанный пик проявляет активность.

Для того, чтобы убедиться, что его наличие не является следствием примеси другого коэлюирующегося соединения, обе части пика были собраны отдельно. Для каждого пика были сняты LCMS спектры. Спектры обеих частей совпали. Таким образом можно сказать, что это формы одного и того же соединения (Рис. 51).

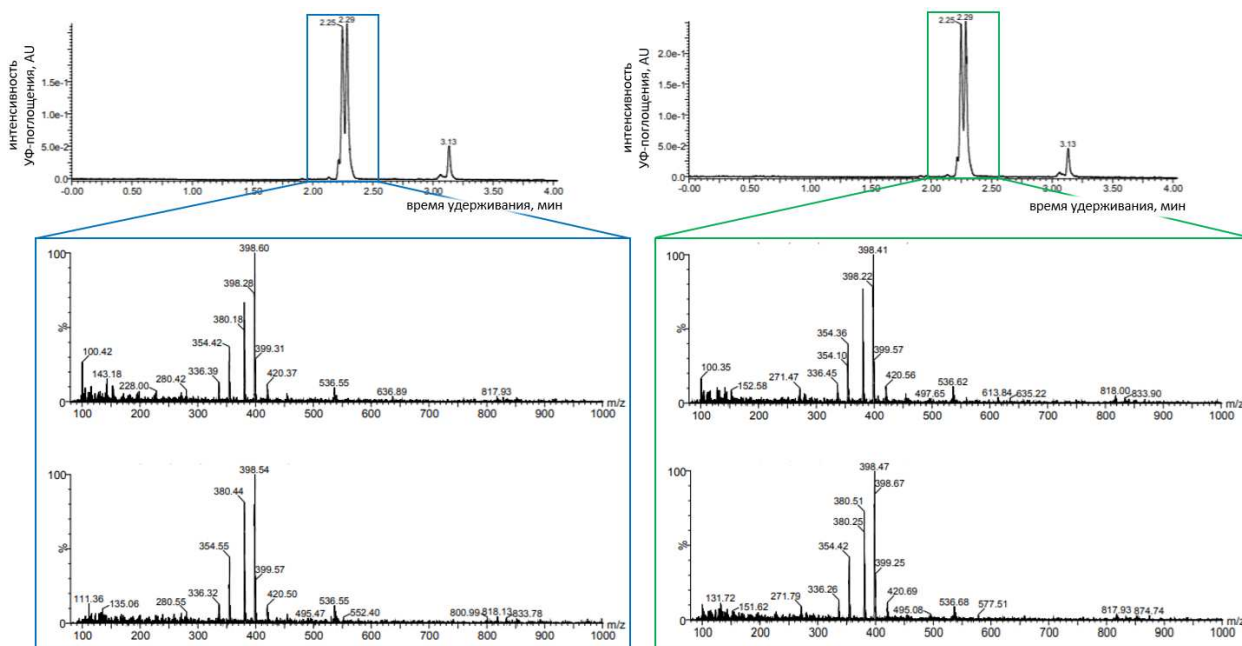


Рис. 51. Масс-спектры и спектры интенсивности УФ-поглощения фракций, собранных при разделении образца 49252-ACN50-1 методом ВЭЖХ. Основной пик (слева, синяя рамка), плечо пика (справа, зелёная рамка).

Для активного компонента был зарегистрирован спектр УФ-поглощения. Наиболее характерный пик наблюдается в районе 400 нм (Рис. 52). Наличие такого характерного поглощения облегчало работу с данным образцом, так как фракции были ярко желтого цвета.

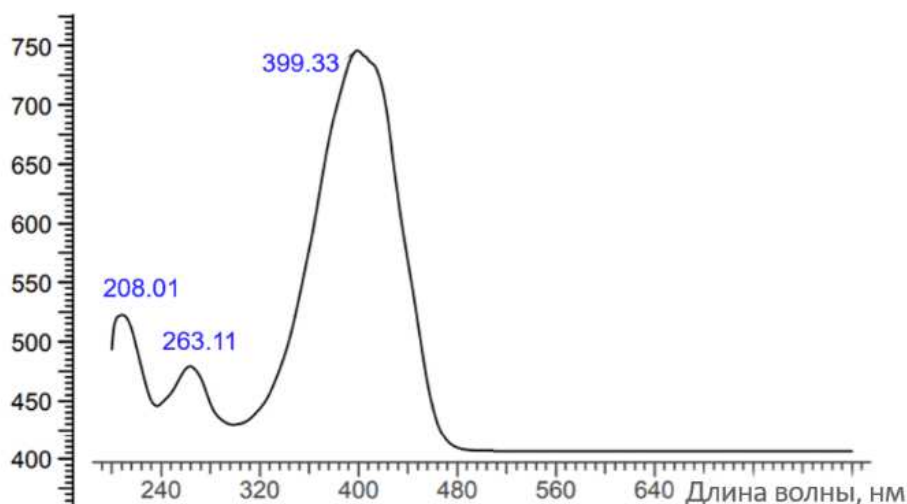


Рис. 52. Спектр УФ-поглощения образца 49252-ACN50-1.

В ходе работы было получено несколько образцов 49252-ACN50-1. Для некоторых из них были сняты масс-спектры высокого разрешения. Чаще всего в режиме положительных зарядов встречались пики с  $m/z$  380 и 398 (Рис. 53). Из этих данных можно было предположить, что масса целевого вещества составляет 398, а 380 — это масса дочернего иона, образовавшегося в результате дегидратации. В пользу массы 398  $[M+H]^+$  было и то, что в режиме положительных ионов встречалась масса 420 которая могла соответствовать аддукту с натрием  $[M+Na]^+$ .

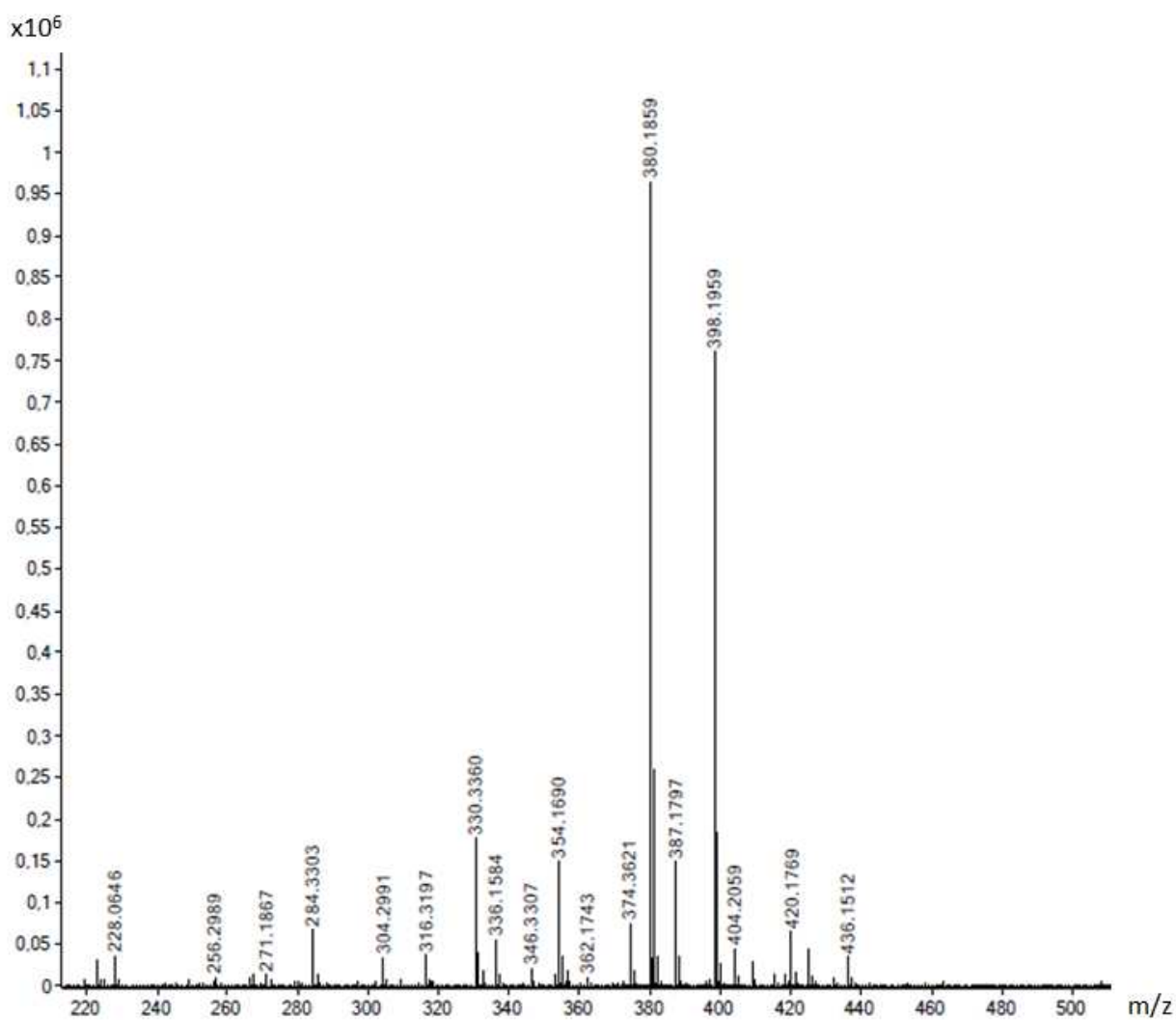


Рис. 53. Масс-спектр образца 49252-ACN50-1, снятый в режиме положительных ионов.

Окончательно разобраться с массой молекулы получилось после анализа результатов масс-спектров зарегистрированных в режиме отрицательных ионов. В них был обнаружен ион  $m/z$  396 (Рис. 54), соответствующий аддукту  $[M-H]^-$ . Следовательно, в таком случае масса целевой молекулы составляет 397 г/моль.

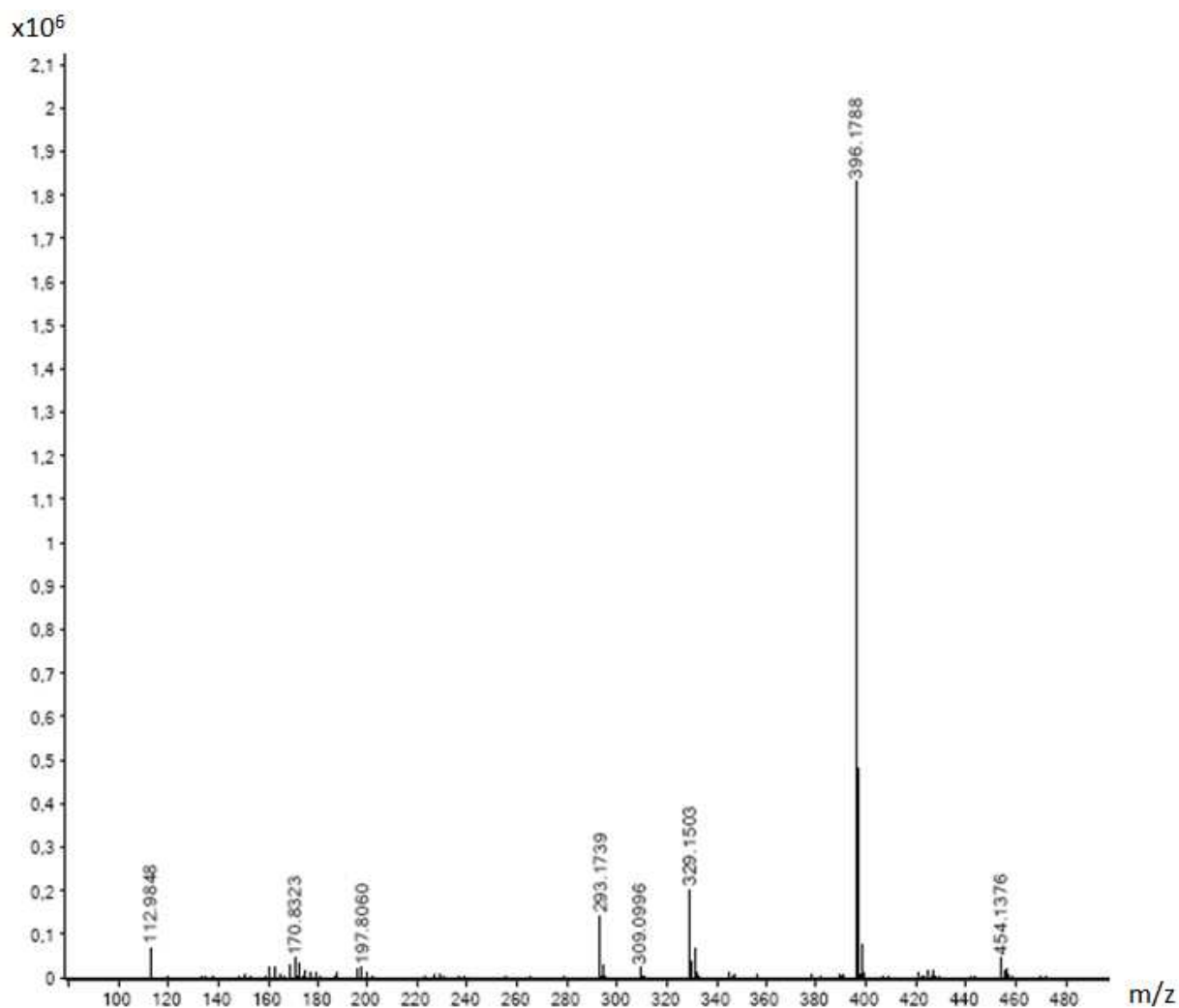


Рис. 54. Масс-спектр образца 49252-ACN50-1, снятый в режиме отрицательных ионов.

Был установлен  $m/z$  иона  $[M-H]^-$ , составивший 396,19143 в отрицательных ионах методом HR-LCMS. Исходя из этих данных была установлена брутто-формула соединения  $C_{23}H_{27}NO_5$ . По данной брутто-формуле был произведен поиск в химических базах данных SciFinder и PubChem. Точных совпадений обнаружено не было. Структура аурапланина



была определена с помощью ЯМР-спектроскопии. Спектр 1D ЯМР  $^1\text{H}$  соединения, выделенного в щелочной среде, где оно показало наибольшую стабильность (Рис. 67, А). В спектре отчетливо видны группа олефиновых и ароматических протонов (5,8-7,1 м.д.), четыре алифатических протона (2,2 - 3,6 м.д.) и три метильные группы (при 2,7 и  $\sim$ 1 м.д.). На Рис. 67, Б представлен спектр  $^{13}\text{C}$  этого соединения, в котором наблюдаются три сигнала в области карбонильных групп (170 - 195 м.д.), три резонанса метильных групп (15-25 м.д.), три сигнала алифатических атомов углерода (40 - 70 м.д.) и 12 сигналов в области олефиновых и ароматических атомов углерода (90 - 140 м.д.). Анализ 2D экспериментов  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY (Рис. 67, А),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (Рис. 67, Б),  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC и  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC (Рис. 67, А, Б), а также  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMBC спектр, измеренный на  $^{15}\text{N}$ -обогащенном аурапланине (Рис. 67, А), позволяет сделать отнесение к большинству наблюдаемых сигналов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ . Топология углеродного скелета соединения однозначно идентифицирована по корреляциям между сигналами  $^{13}\text{C}$  в 2D спектре  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  COSY, измеренным на соединении, обогащенном изотопом  $^{13}\text{C}$  (Рис. 67, Б). На Рис. 55 представлена сводка основных корреляций между ядрами  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , наблюдаемых в спектрах 2D ЯМР аурапланина. Полученные данные свидетельствуют о том, что выделенный антибиотик является производным пирролидина ((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). Следует отметить, что без спектра COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  было бы невозможно строго доказать строение соединения по экспериментальным данным ЯМР, так как отсутствуют корреляции ни с какими протонами наблюдается для атома углерода C3 (Рис. 55), что связано с малой величиной соответствующих констант спин-спинового взаимодействия

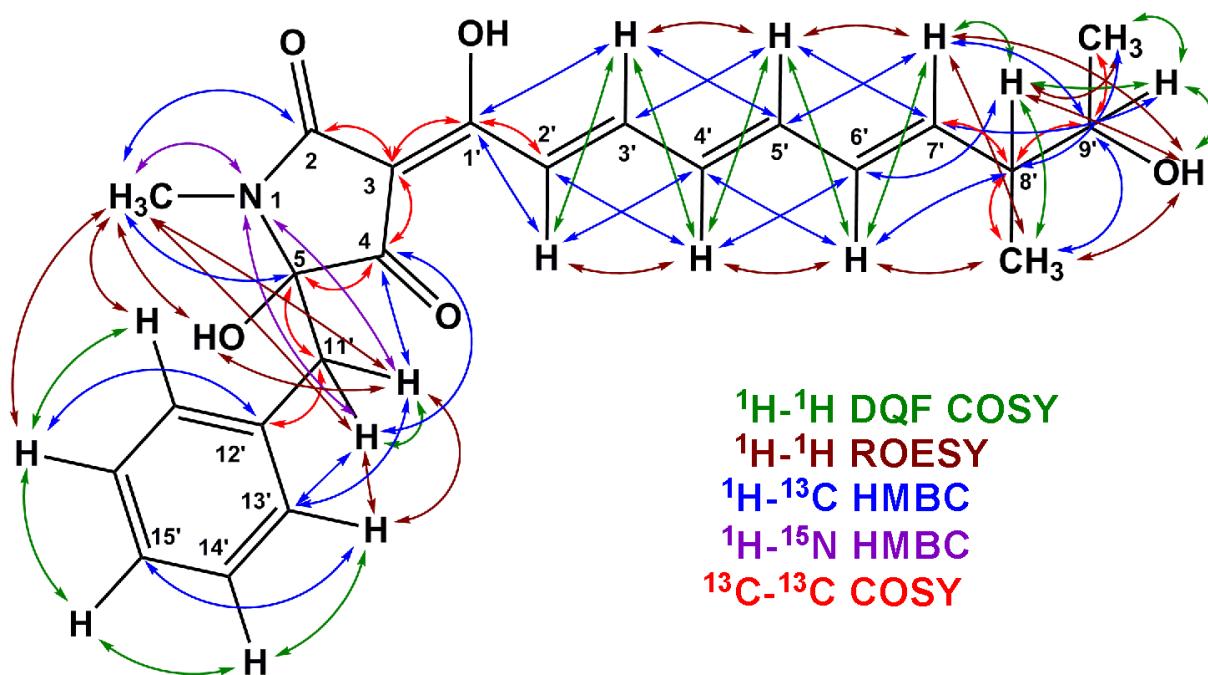


Рис. 55. Структура соединения, выделенного из культуральной жидкости штамма *Actinoplanes* sp. ВКМ Ас-2862, полученная при помощи различных методов ЯМР.

Полученное соединение (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 имеет золотисто-желтый цвет. Было принято решение назвать новое соединение ауралпанином. Эта молекула имеет три структурных мотива: бензольное кольцо, пиррольное кольцо и полиеновый радикал (Рис. 56).

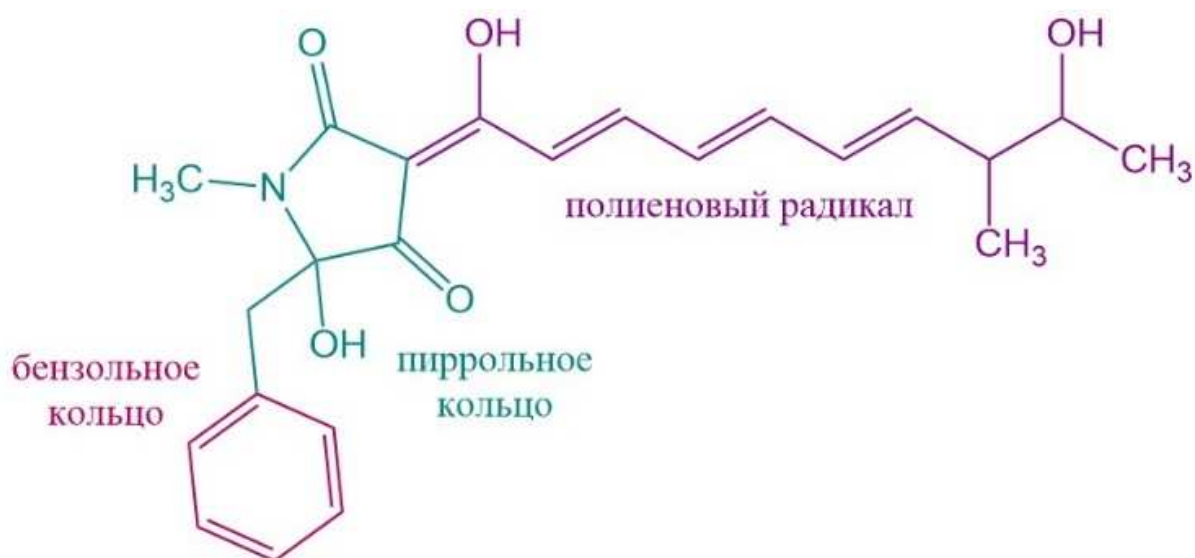


Рис. 56. Структурная формула аурапланина с обозначенными структурными мотивами.

### 3.2.2.2 Трансляция в бесклеточной системе

Перед тем как перейти к *in vitro* экспериментам, было необходимо измерить минимальную ингибирующую концентрацию аурапланина. Для чистого образца антибиотика, действующего на штамм *E. coli*  $\Delta tolC$  *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 (Рис. 57), 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.

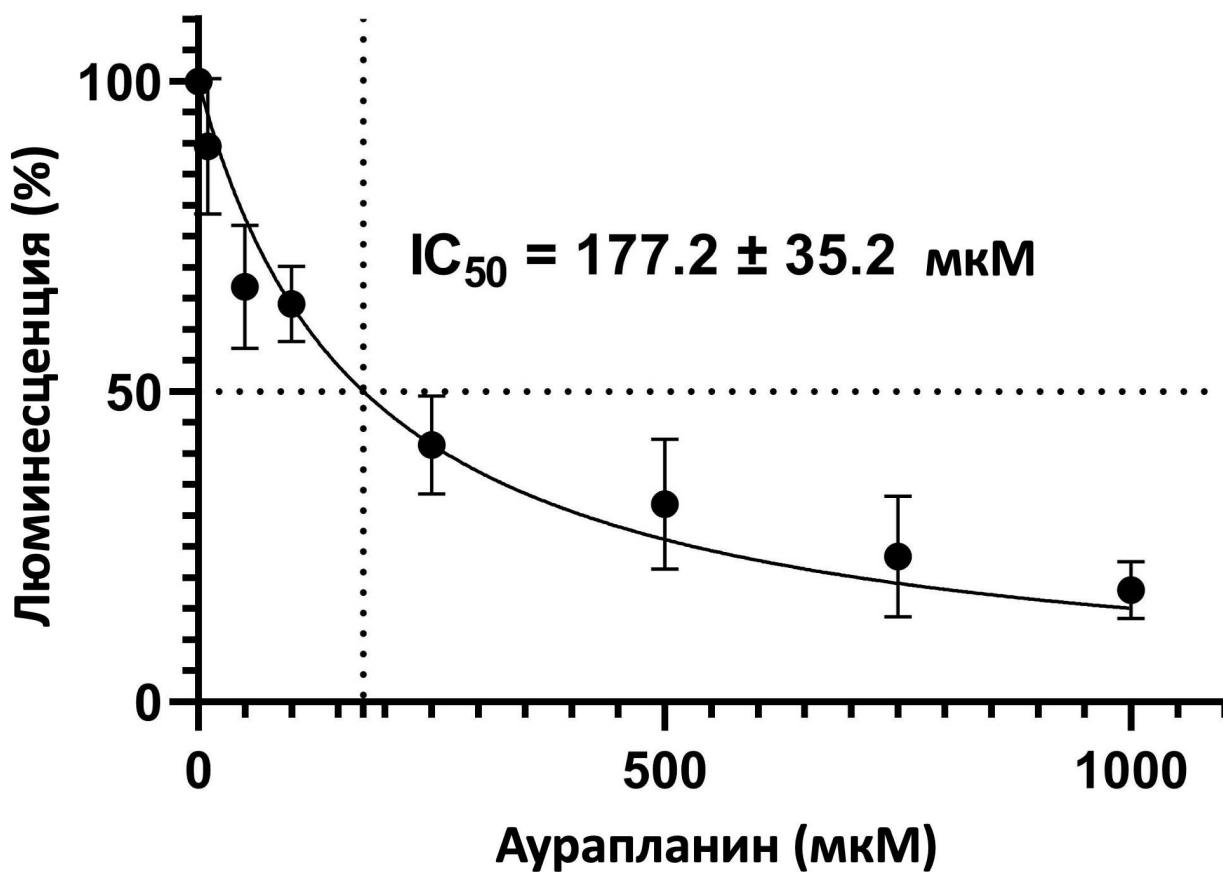


Рис. 57. Трансляция в бесклеточной системе на основе набора *PURExpress* (NEB) с добавлением разных концентрация аураплатина. За 100% взят сигнал от люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе, без добавления ингибиторов трансляции.

Для данного соединения так же была проведена проверка активности в бесклеточной эукариотической системе трансляции. Аураплатин не ингибирует трансляцию в эукариотической системе в концентрации 2,5 мМ (Рис. 58).

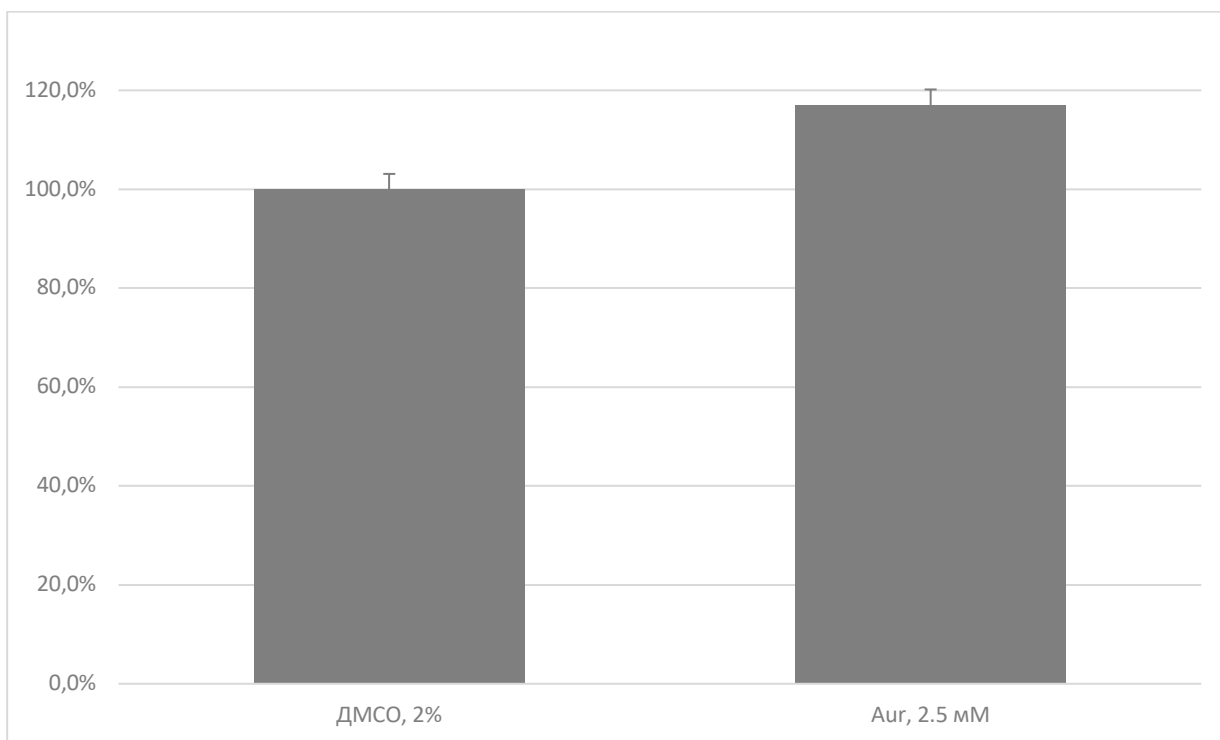


Рис. 58. Трансляция в бесклеточной системе на основе набора Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease-Treated (Promega, США) с добавлением 2,5 мМ аурапланина. За 100% взят сигнал от люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе, без добавления ингибиторов трансляции.

Следующим этапом работы был анализ стадии трансляции, на которой происходит остановка рибосом при помощи тоупринт анализа [81]. Первой матрицей, на которой 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 (Рис. 59, 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 (Рис. 59, Б).

Далее для выяснения специфичности эффекта аурапламина был совершен переход на матрицу RST-1 имеющую по одному кодону каждой аминокислоты. Если сравнить дорожку аурапламина с контрольной (H<sub>2</sub>O), то мы видим, что остановки усиливаются, особенно яркий эффект для пролина, а некоторые остановки исчезают при добавлении аурапламина (Рис. 59, В).

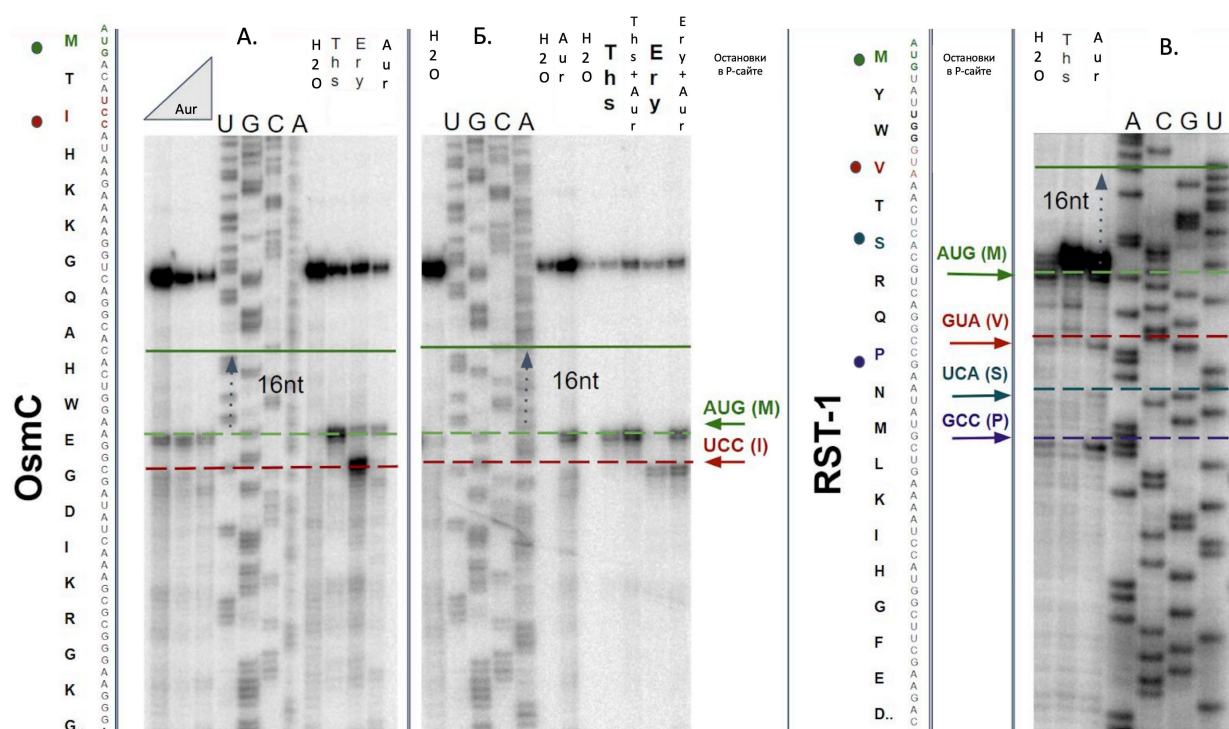


Рис. 59. Тоупринт анализ с аурапламином на матрицах OsmC и RST-1. Слева от гелей аминокислотная и нуклеотидная последовательности соответствующих матриц. Расстояние между положением Р-сайта и его положением на карте секвенирования отличается на 16 нуклеотидов и показано серой пунктирной стрелкой. Закрашенные кружки и стрелки указывают на кодоны, на которых происходят остановки. А – тоупринт анализ на матрице OsmC с разными концентрациями аурапламина, в качестве контрольных образцов используется матрица без ингибитора H<sub>2</sub>O, 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 (Рис. 60, А). 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 (Рис. 60, Б). Любопытно, что с уменьшением концентрации аурапланина паттерн остановок изменяется довольно резко. Для концентраций 800, 200, 50 (три первые дорожки слева) мы ясно видим 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*  $\Delta$ tolC *KanR*) остановка на САА почти полностью исчезает, при этом наиболее яркой становится остановка на иницирующем кодоне AUG, а стопы ниже САА немного теряют интенсивность.

Интересно, что глутамин (Q) был и в OsmC, RST-1, RST-2, ErmD, но в отличие от ErmBL (САА), в тех матрицах он кодируется как САG. Таким образом можно сделать предположение что, аурапланин, вызывает кодон-специфическую остановку. Сопоставив профиль остановок ErmBL аурапланина с зарегистрированными профилями классических ингибиторов больших и малых субъединиц [81], мы обнаружили, что он не имеет очевидного сходства с какими-либо известными случаями. Исходя из этого можно выдвинуть гипотезу, что аурапланин может иметь новый механизм действия.

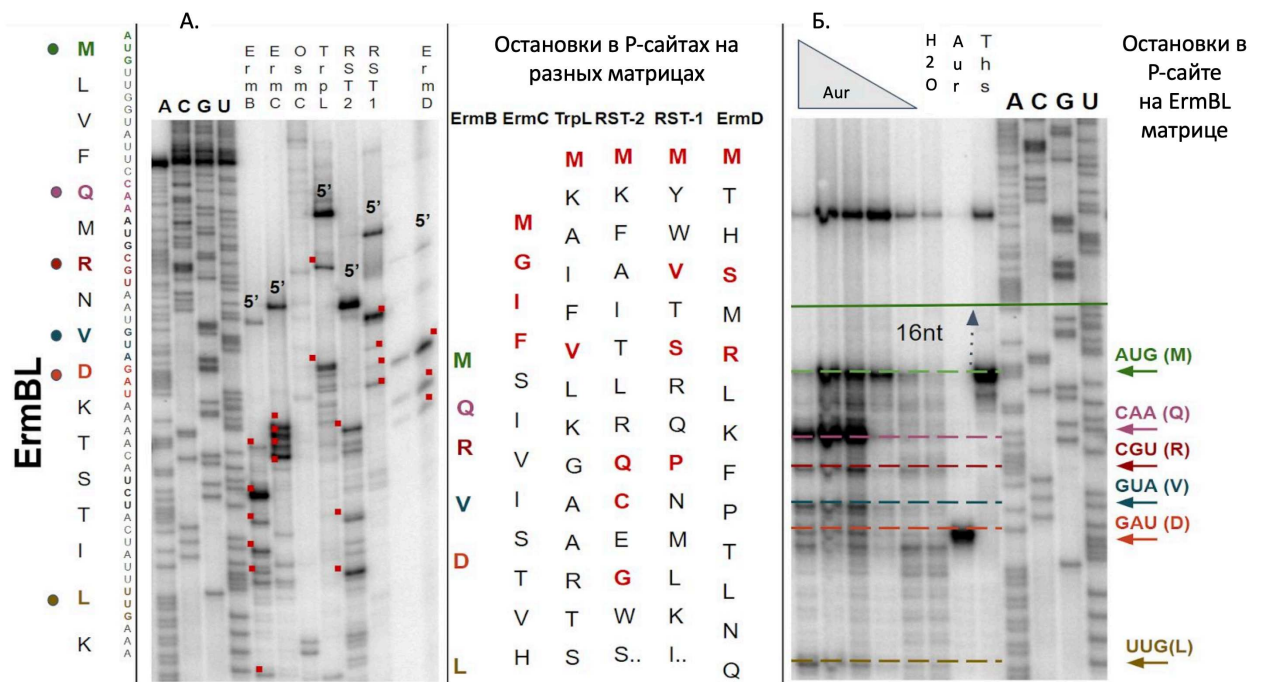


Рис. 60. А - Тоупринт анализ с аурапланином на всех доступных матрицах (ErmB, ErmC, OsmC, TrpL, RST-2, RST-1, ErmD). Слева от гелей аминокислотная и нуклеотидная последовательности ErmBL, остановки вызванные аурапланином показаны закрашенными кружками (те же остановки обозначены на рисунке Б цветными стрелками и надписями). UGCA - секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах на матрице ErmBL, остальные линии соответствуют реакциям тоэпринтинга на разных матрицах в присутствии аурапланина. Красными точками отмечен паттерн остановок, характерный для конкретной матрицы, а эти положения Р-сайтов остановки рибосомы обозначены красным жирным шрифтом в правой части рисунка на аминокислотной последовательности соответствующих матриц. Точки без антибиотика на разных матрицах не представлены. Б - Тоупринт анализ с аурапланином матрице ErmBL при нескольких концентрациях аурапланина (800, 200, 50, 25, 0 мкМ), увеличение концентрации ингибитора показано серым треугольником. Расстояние между положением Р-сайта и его положением на карте секвенирования отличается на 16 нуклеотидов и показано серой пунктирной стрелкой. Цветными стрелками показаны кодоны находящиеся в Р-сайте при остановке трансляции аурапланином. ACGU -



секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах на матрице ErmBL, в качестве контроля использовалась тоупринт реакция без ингибитора (H<sub>2</sub>O), тиострептон в концентрации 50 мкМ (Ths), эритромицин в концентрации 60 мкМ (Ery). При приближении концентрации аурапланина к значению 25 мкМ (это эквивалентно МИК на штамме *E. coli*  $\Delta tolC$  KanR) остановка на САА почти полностью исчезает.

### 3.2.2.3 Поиск устойчивых клонов

Поиск устойчивых клонов осуществлялся с помощью штамма *E. coli* SQ110  $\Delta tolC$ . Особенность этого штамма заключается в том, что в нем удалены 6 оперонов с рРНК из 7 [81]. Данная модификация штамма отличается тем, что если в ходе обретения устойчивости к антибиотику изменяется последовательность ДНК, кодирующая гены рРНК, то это сразу может отобразиться на фенотипе штамма, а также это может облегчить первоначальный поиск мишени. У штамма дикого типа есть одновременно 7 оперонов, кодирующих гены рРНК, и вероятность того, что произойдет одна и та же мутация одновременно во всех 7 оперонах крайне невелика. Еще одной особенностью штамма *E. coli* SQ110  $\Delta tolC$  является то, что в нем удалена последовательность гена *tolC* кодирующего эффлюксную помпу, что препятствует удалению токсичных веществ из клетки и тем самым повышает восприимчивость к антибиотикам.

Для отбора мутантов *E. coli* SQ110  $\Delta tolC$  был осуществлен посев 10<sup>9</sup> клеток на агаризованную среду LB содержащую аураплагин в концентрациях 10, 20, 40 мкг/мл. Возникшие клоны далее были исследованы с помощью секвенирования по Сэнгеру рибосомного оперона. 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), (Рис. 61). 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 (Таб. 7). Что касается случая G558U, то эта мутация была выявлена в ходе скрининга и относится к группе мутантов компенсирующих стрептомицинзависимость ( $Sm^D$ ) [177]. Хотя эта мутация не была охарактеризована фенотипически, авторы отнесли ее «*ribosome ambiguity*» (*ram*) или подверженный ошибкам фенотип, анализируя структурные контакты, в которые вовлечен нуклеотид. Более подробно данные мутации будут рассмотрены далее.

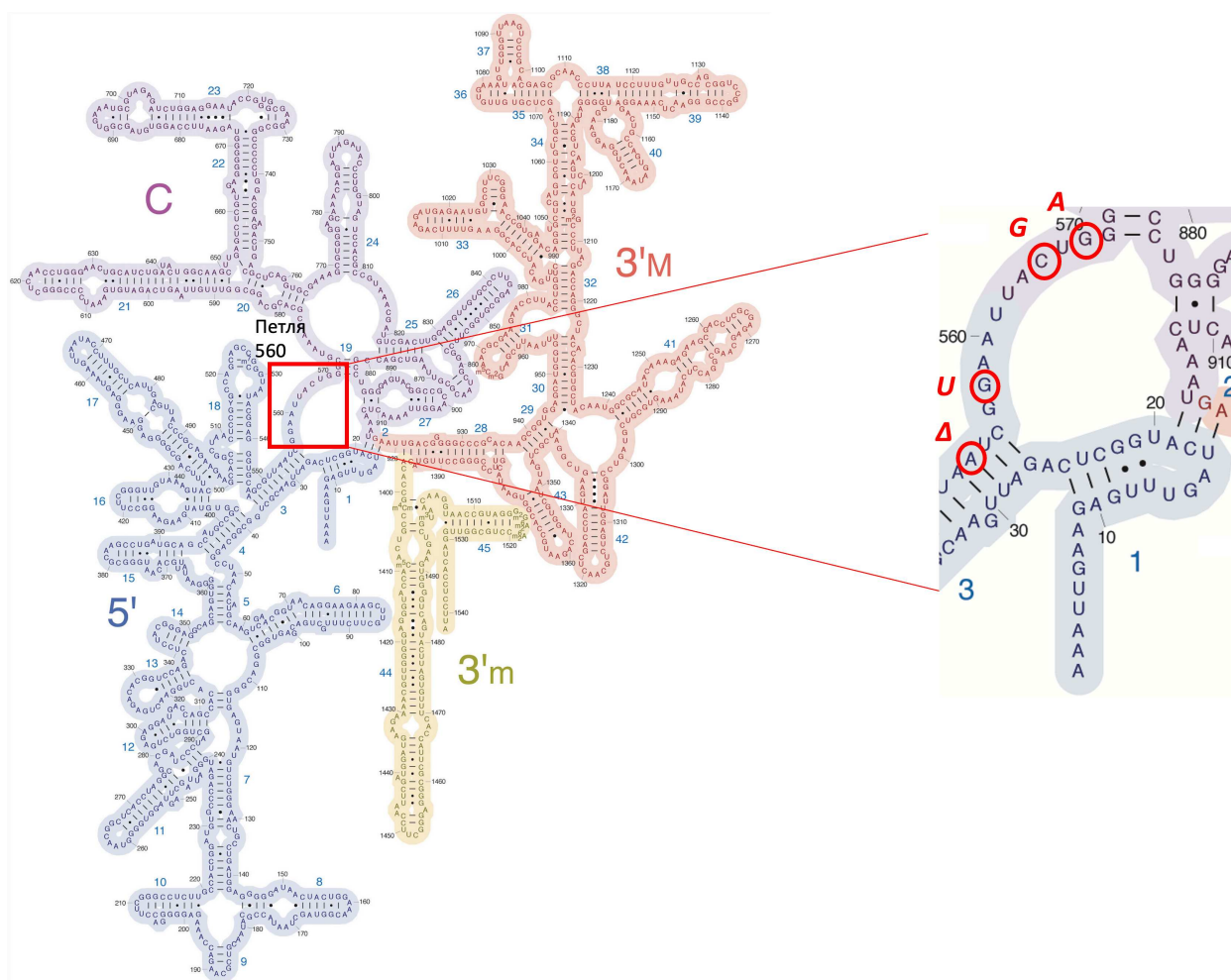


Рис. 61. Часть вторичной структуры 16S рРНК.

Таб. 7. Мутации в 16S рРНК у штаммов устойчивых к аурапланину.

Мутации в 16S рРНК SQ110 wt***mut	МИК в сравнении с контролем	МИК, МКГ/МЛ
--------------------------------------	-----------------------------------	----------------

WT SQ110 <i>ΔtolC</i>	1MIC <sup>wt</sup>	5
A554Deletion	16MIC <sup>wt</sup>	80
G558U	16MIC <sup>wt</sup>	80
C564G	16MIC <sup>wt</sup>	80
G566A	16MIC <sup>wt</sup>	80

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 аурапланина, содержали только одну точечную мутацию, приводящую к замене I200S в рибосомном белке S4.

Таб. 8. Мутации в S4 рибосомном белке у штаммов устойчивых к аурапланину.

Мутации в S4 белке wt***mut	МИК в сравнении с контролем	МИК, мкг/мл
WT <i>ΔtolC</i> / WT SQ110 <i>ΔtolC</i>	1MIC <sup>wt</sup>	10/5
SQ110 <i>ΔtolC</i> S4 I200N	16MIC <sup>wt</sup>	80
SQ110 <i>ΔtolC</i> S4 Y204D	16MIC <sup>wt</sup>	80
SQ110 <i>ΔtolC</i> S4 Y204D	16MIC <sup>wt</sup>	80
<i>ΔtolC</i> S4 I200S	16MIC <sup>wt</sup>	160

Чтобы подтвердить, что выбранные изменения в 16S рРНК были единственной причиной фенотипа устойчивого к аурапланину, мы вводили каждое изменение в штамм *E. coli SQ171 ΔtolC*, который несет одну копию оперона рРНК на сменной плазмиде [81]. Как и ожидалось, МИК для аурапланина 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 (Таб. 9). В совокупности эти результаты демонстрируют, что рибосома является мишенью аурапланина в клетке *E. coli*, и можно

выдвинуть гипотезу, что аураплагин может связываться с малой субъединицей рибосомы в непосредственной близости от рибосомного белка S4 и спиралей h3 и h18 16S рРНК.

Таб. 9. Верификация мутаций устойчивости к аураплагину в 16S рРНК.

Мутации в 16S рРНК SQ171 wt***mut	МИК в сравнении с контролем	МИК, мкг/мл
WT SQ171 <i>ΔtolC</i>	1MIC <sup>wt</sup>	2,5
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S ΔA554	32MIC <sup>wt</sup>	80
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S G558U	32MIC <sup>wt</sup>	80
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S C564G	32MIC <sup>wt</sup>	80
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S G566A	16MIC <sup>wt</sup>	40

#### 3.2.2.4 Структура комплекса антибиотика с рибосомой

Для определения сайта связывания аураплинана 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 Aur складывается с пуриновым азотистым основанием A509, которое расположено внутри выпуклой петли внутри h18 16S рРНК (Рис. 62, 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 [81], и оценили активность аураплинана по отношению к мутантным бактериям (Таб. 10). Замена аденина на любое из пиримидиновых оснований значительно снижала способность аураплинана ингибировать трансляцию, в то время как мутация A509G продемонстрировала более мягкое снижение ингибирования, что свидетельствует о значительном вкладе стэкинг-взаимодействия в связывание аураплинана.

Таб. 10. Проверка мутаций 509 нуклеотида в 16S рРНК на предмет устойчивости аураплинину.

Мутации в 16S рРНК SQ171 wt***mut	МИК в сравнении с контролем	МИК, мкг/мл
WT SQ171 ΔtolC A509	1MICwt	2,5
SQ171 ΔtolC 16S A509C	16MICwt	40
SQ171 ΔtolC 16S A509U	32MICwt	80
SQ171 ΔtolC 16S A509G	8MICwt	20

Олефиновый хвост аураплинана тянется к uS4, при этом концевая изобутильная группа встраивается в гидрофобный карман, образованный боковыми цепями Arg73, Tyr76 и Lys77 в α-спирали 3 и Tyr204 внутри С-

концевой  $\alpha$ -спирали 8 S4 (Д. Вилсон, неопубликованные данные). В это время S4 Arg73, по-видимому, образует взаимодействие  $\pi$ -стекинга с олефиновым хвостом аурапланина. Хотя концевая изобутильная часть AurR плохо разрешена, взаимодействие аурапланина с С-концом S4, по-видимому, имеет решающее значение для активности аурапланина, поскольку мутация либо Y204D, либо I200N/S (Рис. 62, Б), которые находятся поблизости от этой части, придает AurR (Таб. 8).

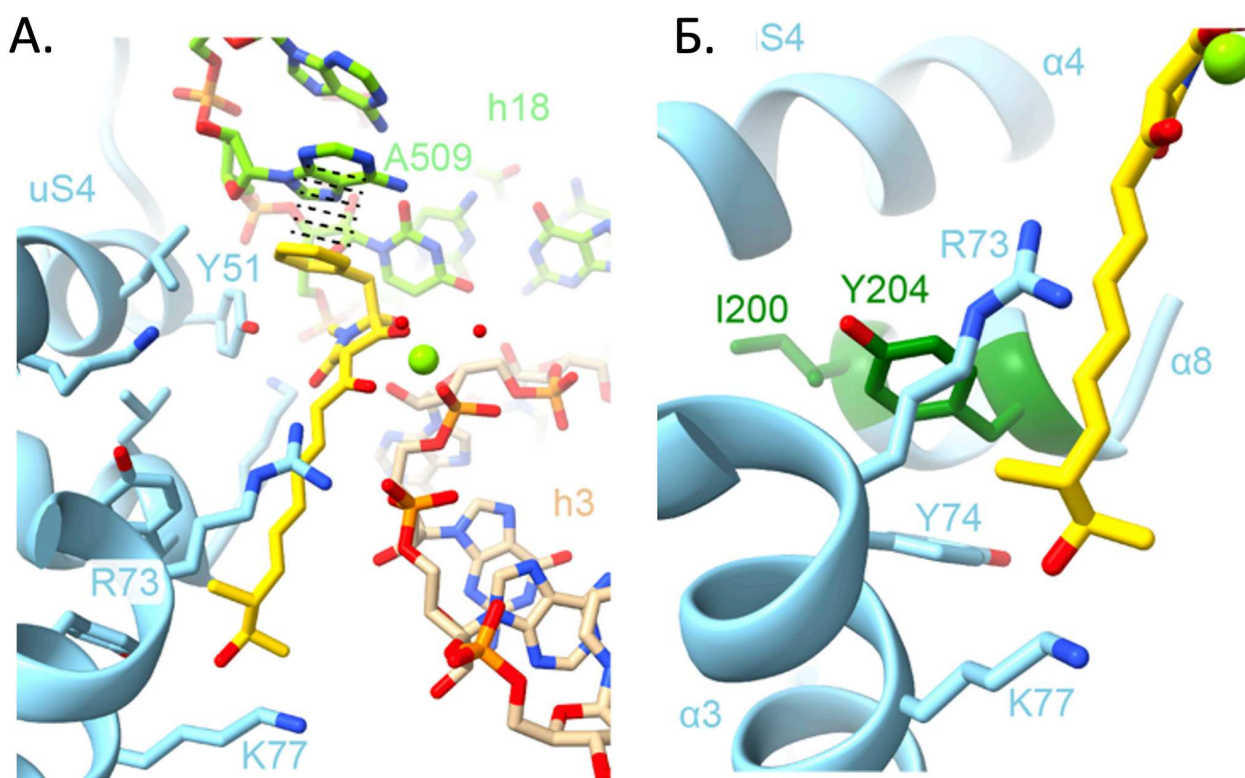


Рис. 62. Структура аурапланина, связанного с рибосомой. А — вид кармана для связывания аурапланина. Пунктирные линии указывают на стэкинг-взаимодействие между фенольной группой аурапланина и 16S рРНК A509. Б - олефиновый «хвост» аурапланина занимает связывающий карман, образованный S4. Положение выбранных 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.

### 3.2.2.5 Чувствительность *Ram* и *Res* мутантов к аурапланину

Стрептомицин является антибиотиком структурно родственным семейству аминогликозидов, и так же, как аминогликозиды вызывает ошибки в трансляции [11]. 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 (Рис. 63 А). При выборе правильной или родственной тРНК рибосомой происходит закрытие домена 30S субъединицы, где головка и «платформа» (боковая лопасть) смыкаются на А-тРНК тРНК [17] (стрелка на Рис. 63 Б).

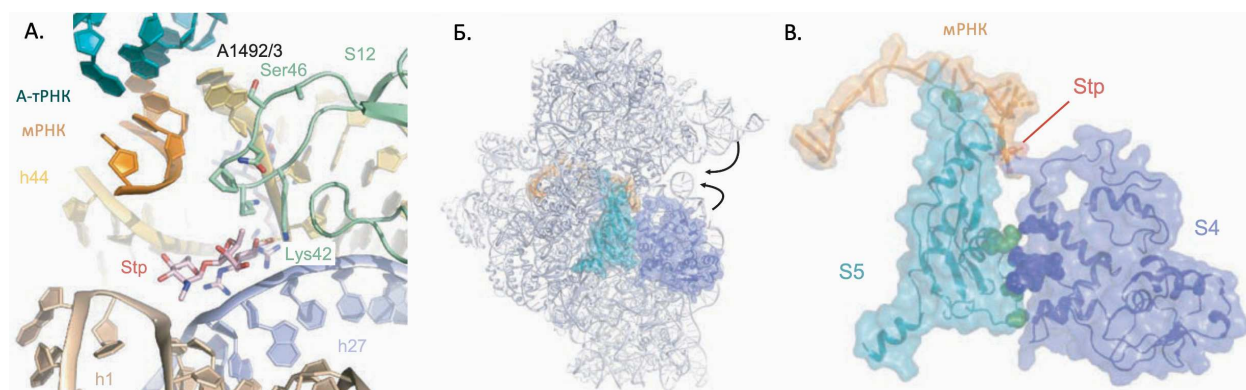


Рис. 63. Стрептомицин и точность трансляции. А - детальный вид сайта связывания стрептомицина. Стрептомицин (красный) взаимодействует исключительно с сахарофосфатным остовом 16S. Б - изображение 30S субъединицы с выделенными рибосомными белками S4 (синий), S5 (бирюзовый) и мРНК (оранжевый). В - изображение взаимодействия между S4 и S5, с *ram* мутациями, обозначенными более темным цветом, стрептомицин (красный) [11].

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 (Рис. 63

А) [11]. Из мутаций в рибосомном белке S12, дающих устойчивость к Str только позиция Lys42 непосредственно контактирует со Str (Рис. 63 А), 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 мутаций S12 [11] (Рис. 63 Б, В). 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 это 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. Переход в закрытую форму включает в себя, первое, нарушение множественных взаимодействий на границе между S4 и S5 рибосомными белками, второе, установление взаимодействий за счет солевого мостика между рибосомным белком S12 и либо h44, либо h27 16S рРНК.

Предполагается, что мутации в S4 и S5, способствующие формированию *ram* состояния, частично приводят к переходу в закрытое состояние, однако это может не обязательно коррелировать с нарушениями на границе S4-S5 [178]. Напротив, мутации в S12, которые блокируют образование солевого мостика, могут дестабилизировать закрытую форму и вызвать устойчивость от Str (или, в некоторых случаях, даже зависимость от Str). Наблюдаются антагонистические эффекты *ram* мутантов S4/S5 по дестабилизации закрытой формы и устойчивых к стрептомицину мутантов S12 стабилизирующие закрытую форму. Этими эффектами могут быть объяснены компенсаторные эффекты, наблюдаемые в отношении точности трансляции.

Исходя из полученных данных, было замечено, что мутация 16S рРНК G558U [177], а также мутации S4 I200N [179, 180] и I200S, которые получились в результате отбора устойчивых к аурапланину клонов (



Таб. 7, Таб. 8), имеют, по данным научной литературы, *ram* фенотип, то есть ведут к снижению точности трансляции. Более того, хотя вариант S4 Y204D (Таб. 8), 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* [181]. Поэтому, чтобы проверить, могут ли другие известные *ram* мутации также вызывать устойчивость к аурапланину, мы внесли *ram* мутации A160G, G299A и G347U [182] в 16S рРНК и проверили их влияние на МИК аурапланина Aur (Таб. 11). Мы обнаружили, что каждая из этих *ram* мутаций приводит к 16–32-кратному увеличению устойчивости к аурапланину (Таб. 11), несмотря на то что они расположены далеко от сайта связывания аурапланина. Напротив, мутации C1054U и G1491A в 16S рРНК, расположенные в центре декодирования не приводящие к ошибкам при трансляции [182], не влияли на восприимчивость к Aur (Таб. 11).

Таб. 11. Проверка *ram* мутаций в 16S рРНК на предмет устойчивости аурапланину.

Мутации в 16S рРНК SQ171 wt***mut	МИК в сравнении с контролем	МИК, мкг/мл
WT SQ171 <i>ΔtolC</i>	1MIC <sup>wt</sup>	2,5
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S A160G	16MIC <sup>wt</sup>	40
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S G299A	32MIC <sup>wt</sup>	80
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S G347U	32MIC <sup>wt</sup>	80
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S C1054U	1MIC <sup>wt</sup>	2,5
SQ171 <i>ΔtolC</i> 16S G1491A	0,5MIC <sup>wt</sup>	1,25

Поскольку мутации *ram* могут подавлять *res* (сверхточный) фенотип мутаций устойчивости к стрептомицину, мы также оценили, могут ли эти

мутации влияют на чувствительность к аурапланину. Для этого мы создали штаммы *ΔtolC*, несущие хорошо охарактеризованную мутацию устойчивости к стрептомицину K43N в рибосомном белке S12, и определили МИК для аурапланина (Таб. 12). В отличие от штаммов *ram*, *res* штамм устойчивый к стрептомицину K43N сохранял чувствительность к аурапланину даже в присутствии высоких концентраций стрептомицина, что согласуется данными о мутации K43N, препятствующей связыванию стрептомицина [183]. В совокупности наши результаты показывают, что *ram* мутации, которые способствуют неправильному прочтению, обычно придают устойчивость к аурапланину, тогда как ограничительные мутации, которые способствуют гиперточности, имеют тенденцию сохранять чувствительность к аурапланину.

Таб. 12. 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 $\Delta tolC$	1MICwt	10
$\Delta tolC$ S12 K43N	0,25MICwt	2,5
$\Delta tolC$ S12 K43N (Str 0.5 $\mu g/ml$ )	0,25MICwt	2,5
$\Delta tolC$ S12 K43N (Str 50 $\mu g/ml$ )	5MICwt	0,5

### 3.2.2.6 Тест на ошибки в трансляции

Учитывая наблюдаемое взаимодействие *ram* и *res* мутаций с устойчивостью и чувствительностью к аурапланину, мы решили напрямую оценить влияние аурапланина 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/ААG восстанавливающей активность люциферазы [184]. 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 (Рис. 64, А). В то время как добавление аурапламина также приводило к умеренному (в 3 раза) увеличению ошибочного считывания, аурапламин, по-видимому, сильно противодействовал эффекту стрептомицина, снижая уровень неправильного считывания в 10 раз, когда в анализе использовались оба соединения. Точно так же присутствие аурапламина 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) (Рис. 64, Б). Мы также 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 *AtolC*, 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 (Рис. 64, В).

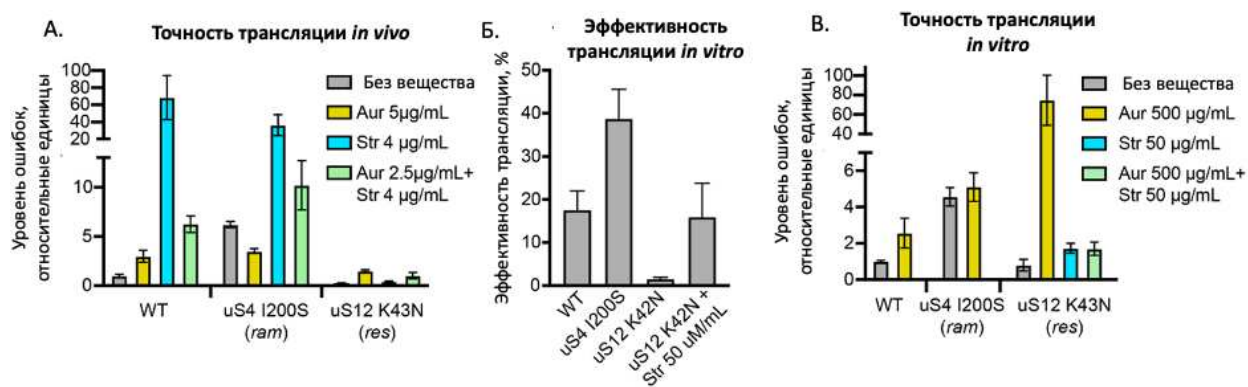


Рис. 64. А - точность трансляции *in vivo* *ΔtolC* мутантов по белкам S4 (*ram*), S12 (*res*) в присутствии аурапланина, стрептомицина и их комбинации. Точность измерялась с помощью репортера на основе люциферазы *Renilla* (*Rluc*), используемого в качестве контроля, и люциферазы светлячка (*Fluc*) с инактивирующей мутацией K529N (от AAA до AAU) каталитического остатка [184], 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 аурапланина. Эффективность трансляции рассчитывали, как отношение сигнала в присутствии и в отсутствие аурапланина. В - точность трансляции *in vitro* *ΔtolC* мутантов по белкам S4 (*ram*), S12 (*res*) в присутствии аурапланина, 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 [184], 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 аурапланину, в то время как мутант *res* S12 K43N гиперчувствителен к аурапланину, и эта гиперчувствительность подавляется стрептомицином (Рис. 64, 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 одилорхабдины. Аминогликозиды взаимодействуют непосредственно с центром декодирования, предрасполагая его к восприятию почти родственной aa-tРНК и ингибируя транслокацию. Стрептомицин действует на конформационное изменение рибосомы, сопровождающее процесс декодирования, замораживая конформацию [185], 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 [186], контактирующем с h44 при стабилизации открытой конформации малой субъединицы [187]. В отличие от этого, *ram* мутации [188, 189] обеспечивающие независимость от стрептомицина, возникающие в основном за счет мутаций в рибосомных белках S4 и S5 [66, 190] и в 16S рРНК стабилизируют закрытую конформацию субъединицы [191]. В этой работе было обнаружено, что выбранные мутации устойчивости к аурапламину 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 [182], 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 [192]. В данной работе было проверено пять известных *ram* мутаций — А160G, G299А, G347U, С1054А и G1491А. Мутации С1054А и G1491А, расположенных близко к А-участку нуклеотидов, не влияют на активность Ауг, в то же время замены А160G, G299А и G347U значительно повышают устойчивость. Мутации G299А 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 G299А плечо 30S повернуто внутрь и декодирующий нуклеотид G530 переворачивается в антиконформацию [191]. Мутация А160G могла нарушить тройное взаимодействие между G347, С342 (оба из h14) и А160 (h8), а также разрушить мостик В8 [191, 193]. Несмотря на схожий эффект на неправильное кодирование, эти две группы имеют разные механизмы действия - С1054А и G1491А повышают эффективность связывания почти родственных тРНК, но не влияют на стадию корректирования, G299А 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 аурапланина 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 аурапланина 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 Aur в основном проявляется в снижении принятия родственной aa-тРНК, что приводит к общему снижению точности.

### 3.2.2.7 Тест на токсичность и тест на панели микроорганизмов

Для оценки возможностей потенциального применения аурапланина мы провели скрининг его активности в отношении некоторых видов микроорганизмов (Таб. 13). Аураплагин практически не проявляет активности в отношении большинства микроорганизмов за исключением штаммов *E. coli* с делецией по гену TolC, а также артробактера. Однако очень интересен эффект на клинически значимый штамм *Mycobacterium tuberculosis*, МИК для которого составил 7,1 мкг/мл.

Таб. 13 Сводная Таб. 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
<i>Acinetobacter baumannii</i>	>100
<i>Aerococcus viridans</i>	>100
<i>Arthrobacter sp.</i>	12
<i>Bacillus subtilis</i>	>100

<i>Citrobacter koseri</i>	>100
<i>E. coli</i> $\Delta$ tolC KanR	12
<i>E. coli</i> $\Delta$ tolC KanS	12
<i>Enterobacter cloacae</i>	>100
<i>Enterococcus faecalis</i>	>100
<i>Enterococcus faecium</i>	>100
<i>Escherichia coli</i> BL 21(DE3)	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100
<i>Lactococcus lactis</i>	100
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	50
<i>Micrococcus luteus</i>	100
<i>Morganella morganii</i>	>100
<i>Proteus mirabilis</i>	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100
<i>Serratia marcescens</i>	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	>100
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	>100
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	>100
<i>Staphylococcus vitulinus</i> 130-2	>100
<i>Staphylococcus vitulinus</i> 152-00	>100
<i>Staphylococcus warnerii</i>	>100
<i>Staphylococcus xylosum</i>	>100
<i>Str. agalactiae</i>	100
<i>Str. anisus</i>	>100
<i>Str. parasanguinus</i>	>100
<i>Str. salvarius</i>	100
<i>Streptococcus agalactiae</i> 3 str	>100
<i>Streptococcus parasanguinus</i> 60 str	>100
<i>Streptococcus salvarius</i> 497 str	100
<i>Weissella confusa</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, который



показал значение  $CC_{50}$  для аурапланина в диапазоне от 11 до 15 (Рис. 65), 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.

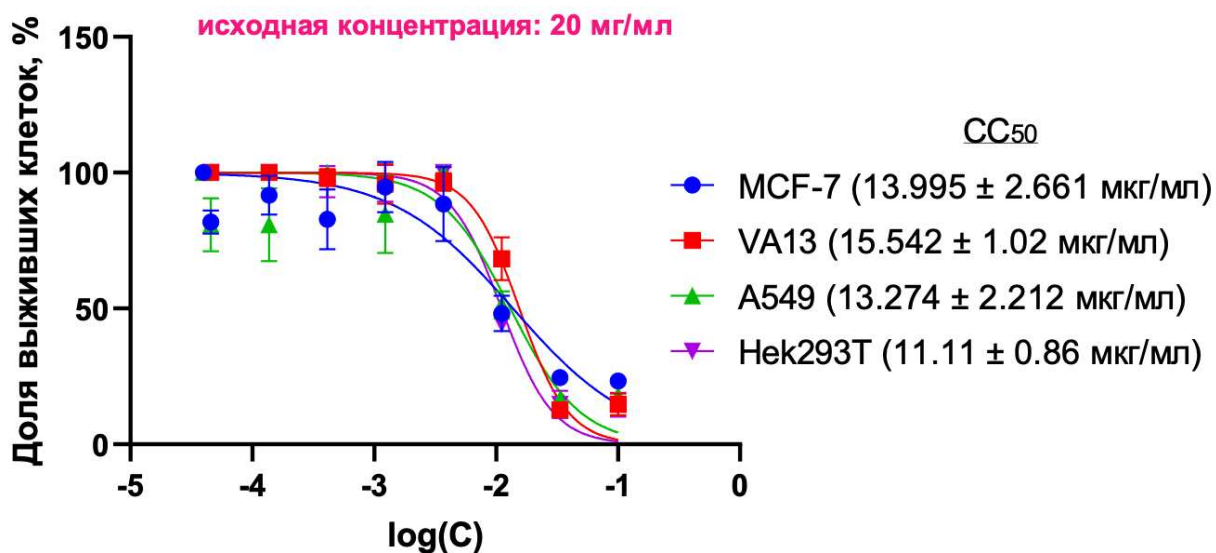


Рис. 65. МТТ-тест для аурапланина. По оси ординат обозначен процент выживших клеток, по оси абсцисс десятичный логарифм концентрации аурапланина.

#### 4. 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 60213 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, в виду 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 доксорубицина. Тетраценомицин X, в отличие от доксорубицина, 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 ингибируют 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 (ΔA554, 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.

## 5. Благодарности

Автор выражает благодарность всем, кто так или иначе поспособствовал развитию данного исследования.

В первую очередь научным руководителям д.х.н. Илье Андреевичу Остерману и д.х.н., член-корр. РАН Петру Владимировичу Сергееву. Хотелось бы отметить, что такого хорошего руководителя, как Илья, я и желать не мог, когда начинал работать над этой темой. Его вклад в возникновение и развитие этого исследования невозможно переоценить. Он всегда очень увлеченно относится к своей работе, что всегда вдохновляет относиться к своим проектам с таким же рвением. Я также очень благодарен профессору Петру Владимировичу, всегда внимательно и с интересом участвовал в этом исследовании, давал советы по развитию проекта в особо сложные моменты, когда не виден был дальнейший путь.

Отдельная благодарность заведующей лабораторией д.х.н, академику РАН Ольге Анатольевне Донцовой за возможность выполнения работы в ее лаборатории. На протяжении всего моего пути в этой лаборатории она всегда способствовала моему развитию в данной области.

Я также благодарен своим коллегам, с которыми я работал в лаборатории проф. Донцовой, особенно подгруппе занимающейся антибиотиками. В частности, хочу поблагодарить моих коллег и друзей Марину Валерию, Волынкину Инну, Мавиза Принца и Лисевич Ирину. Особая благодарность Лисевич Ирине, которая внесла огромный вклад в эту работу и всегда мотивировала продолжать работу над проектом связанным с аурапланином, даже в тех случаях, когда все наши гипотезы провалилась и мы не видели дальнейшего пути по выяснению механизма его действия.

Эта работа была бы невозможна без наших сильных сотрудников, которые внесли большой вклад в эту работу. Хочу поблагодарить к.х.н. Ташлицкого В.Н., к.х.н. Алферову В.А., Чернышову А.П. за ВЭЖХ очистку образцов, д.х.н. В.И. Полшакова за ЯМР-анализ образцов, к.б.н. М.В.Бирюкова, к.б.н. Ю.В. Закалюкину, Никандрову А.А. за наработку культуральных жидкостей и

помощь в дальнейшей работе с ними, к.х.н. Скворцова Д.А. для МТТ-анализа. Все мои ученики за это время проделали колоссальную работу.

Я также хотел бы поблагодарить своих родителей за предоставленную мне прекрасную возможность учиться все это время, а также за их поддержку. А также сестру Евгению, за помощь в тяжелые моменты. Кроме того, я хотел бы поблагодарить вас за поддержку всю мою семью.

И, наконец, я очень благодарен своей жене Анне Лукьяновой. Она всегда вдохновляет меня продолжать работу. Отдельное спасибо за помощь в подготовке материалов и корректуре данной работы.

## 6. Список литературы

1. Poupard J. A., Rittenhouse S. F., Walsh L. R. The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods // *Adv Exp Med Biol.* – 1994. – Т. 349. – С. 3-14.
2. Roberts W. Studies on Biogenesis // *Proceedings of the Royal Society of London.* – 1873-1874. – Т. 164, № 289-291.
3. Fleming A., Wright A. E. A comparison of the activities antiseptics on bacteria and on leucocytes // *Proceedings of the Royal Society of London.* – 1924. – Т. 96, № 674. – С. 171-180.
4. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae* // *Br J Exp Pathol.* – 1929. – Т. 10, № 3. – С. 226-36.
5. Основы учения об антибиотиках. / Егоров Н. С. – Москва: Издательство МГУ, 2004. – 24 с.
6. Walsh C. Where will new antibiotics come from? // *Nat Rev Microbiol.* – 2003. – Т. 1, № 1. – С. 65-70.
7. Wilson D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance // *Nat Rev Microbiol.* – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 35-48.
8. Tackling drug-resistant infections globally. / J.O'Neill – London: The Review on Antimicrobial Resistance, 2016. – 81 с.
9. Weber W., Zahner H., Siebers J., Schroder K., Zeeck A. [Metabolic products of microorganisms. 175. Tetracenomycin C (author's transl)] // *Arch Microbiol.* – 1979. – Т. 121, № 2. – С. 111-6.
10. Lin J., Zhou D., Steitz T. A., Polikanov Y. S., Gagnon M. G. Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design // *Annu Rev Biochem.* – 2018. – Т. 87. – С. 451-478.
11. Wilson D. N. The A-Z of bacterial translation inhibitors // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2009. – Т. 44, № 6. – С. 393-433.
12. Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation // *Cell.* – 2002. – Т. 108, № 4. – С. 557-72.
13. Gualerzi C. O., Pon C. L. Initiation of mRNA translation in prokaryotes // *Biochemistry.* – 1990. – Т. 29, № 25. – С. 5881-9.
14. Hartz D., Binkley J., Hollingsworth T., Gold L. Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF3 // *Genes Dev.* – 1990. – Т. 4, № 10. – С. 1790-800.
15. Zucker F. H., Hershey J. W. Binding of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor IF1 to 30S ribosomal subunits measured by fluorescence polarization // *Biochemistry.* – 1986. – Т. 25, № 12. – С. 3682-90.
16. Zaher H. S., Green R. Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis // *Cell.* – 2009. – Т. 136, № 4. – С. 746-62.
17. Ogle J. M., Murphy F. V., Tarry M. J., Ramakrishnan V. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form // *Cell.* – 2002. – Т. 111, № 5. – С. 721-32.

18. Demeshkina N., Jenner L., Westhof E., Yusupov M., Yusupova G. A new understanding of the decoding principle on the ribosome // *Nature*. – 2012. – T. 484, № 7393. – C. 256-9.
19. Zaher H. S., Green R. Hyperaccurate and error-prone ribosomes exploit distinct mechanisms during tRNA selection // *Mol Cell*. – 2010. – T. 39, № 1. – C. 110-20.
20. Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Tarry M. J., Carter A. P., Ramakrishnan V. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit // *Science*. – 2001. – T. 292, № 5518. – C. 897-902.
21. Geigenmüller U., Nierhaus K. H. Significance of the third tRNA binding site, the E site, on *E. coli* ribosomes for the accuracy of translation: an occupied E site prevents the binding of non-cognate aminoacyl-tRNA to the A site // *EMBO J*. – 1990. – T. 9, № 13. – C. 4527-33.
22. Szaflarski W., Vesper O., Teraoka Y., Plitta B., Wilson D. N., Nierhaus K. H. New features of the ribosome and ribosomal inhibitors: non-enzymatic recycling, misreading and back-translocation // *J Mol Biol*. – 2008. – T. 380, № 1. – C. 193-205.
23. Ogle J. M., Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity // *Annu Rev Biochem*. – 2005. – T. 74. – C. 129-77.
24. Rodnina M. V., Gromadski K. B., Kothe U., Wieden H. J. Recognition and selection of tRNA in translation // *FEBS Lett*. – 2005. – T. 579, № 4. – C. 938-42.
25. Mittelstaet J., Konevega A. L., Rodnina M. V. Distortion of tRNA upon near-cognate codon recognition on the ribosome // *J Biol Chem*. – 2011. – T. 286, № 10. – C. 8158-8164.
26. Jenner L., Demeshkina N., Yusupova G., Yusupov M. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step // *Nat Struct Mol Biol*. – 2010. – T. 17, № 9. – C. 1072-8.
27. Schmeing T. M., Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation // *Nature*. – 2009. – T. 461, № 7268. – C. 1234-42.
28. Zeng X., Chugh J., Casiano-Negrone A., Al-Hashimi H. M., Brooks C. L. Flipping of the ribosomal A-site adenines provides a basis for tRNA selection // *J Mol Biol*. – 2014. – T. 426, № 19. – C. 3201-3213.
29. Gromadski K. B., Daviter T., Rodnina M. V. A uniform response to mismatches in codon-anticodon complexes ensures ribosomal fidelity // *Mol Cell*. – 2006. – T. 21, № 3. – C. 369-77.
30. Schmeing T. M., Voorhees R. M., Kelley A. C., Gao Y. G., Murphy F. V., Weir J. R., Ramakrishnan V. The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA // *Science*. – 2009. – T. 326, № 5953. – C. 688-694.
31. Daviter T., Gromadski K. B., Rodnina M. V. The ribosome's response to codon-anticodon mismatches // *Biochimie*. – 2006. – T. 88, № 8. – C. 1001-11.
32. Yonath A., Leonard K. R., Wittmann H. G. A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction // *Science*. – 1987. – T. 236, № 4803. – C. 813-6.
33. Frank J., Zhu J., Penczek P., Li Y., Srivastava S., Verschoor A., Radermacher M., Grassucci R., Lata R. K., Agrawal R. K. A model of protein synthesis based on

- cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome // *Nature*. – 1995. – T. 376, № 6539. – C. 441-4.
34. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis // *Science*. – 2000. – T. 289, № 5481. – C. 920-30.
35. Voss N. R., Gerstein M., Steitz T. A., Moore P. B. The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel // *J Mol Biol*. – 2006. – T. 360, № 4. – C. 893-906.
36. Ito K., Chiba S., Pogliano K. Divergent stalling sequences sense and control cellular physiology // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2010. – T. 393, № 1. – C. 1-5.
37. Gong F., Yanofsky C. Instruction of translating ribosome by nascent peptide // *Science*. – 2002. – T. 297, № 5588. – C. 1864-7.
38. Vázquez D. Inhibitors of protein biosynthesis // *Mol Biol Biochem Biophys*. – 1979. – T. 30. – C. i-x, 1-312.
39. Oleinick N. L., Corcoran J. W. Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic-sensitive and -resistant *Bacillus subtilis* 168 // *J Biol Chem*. – 1969. – T. 244, № 4. – C. 727-35.
40. Ackermann G., Rodloff A. C. Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647)--the first ketolide // *J Antimicrob Chemother*. – 2003. – T. 51, № 3. – C. 497-511.
41. Menninger J. R., Coleman R. A., Tsai L. N. Erythromycin, lincosamides, peptidyl-tRNA dissociation, and ribosome editing // *Mol Gen Genet*. – 1994. – T. 243, № 2. – C. 225-33.
42. TAUBMAN S. B., SO A. G., YOUNG F. E., DAVIE E. W., CORCORAN J. W. EFFECT OF ERYTHROMYCIN ON PROTEIN BIOSYNTHESIS IN *BACILLUS SUBTILIS* // *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*. – 1963. – T. 161. – C. 395-401.
43. Starosta A. L., Karpenko V. V., Shishkina A. V., Mikolajka A., Sumbatyan N. V., Schlutzen F., Korshunova G. A., Bogdanov A. A., Wilson D. N. Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition // *Chem Biol*. – 2010. – T. 17, № 5. – C. 504-14.
44. Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome // *J Mol Biol*. – 2003. – T. 330, № 5. – C. 1005-14.
45. Ettayebi M., Prasad S. M., Morgan E. A. Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli* // *J Bacteriol*. – 1985. – T. 162, № 2. – C. 551-7.
46. Moazed D., Noller H. F. Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA // *Biochimie*. – 1987. – T. 69, № 8. – C. 879-84.
47. Bulkley D., Innis C. A., Blaha G., Steitz T. A. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2010. – T. 107, № 40. – C. 17158-63.
48. Andersson S., Kurland C. G. Elongating ribosomes in vivo are refractory to erythromycin // *Biochimie*. – 1987. – T. 69, № 8. – C. 901-4.



49. Lovmar M., Nilsson K., Vimberg V., Tenson T., Nervall M., Ehrenberg M. The molecular mechanism of peptide-mediated erythromycin resistance // *J Biol Chem.* – 2006. – T. 281, № 10. – C. 6742-50.
50. Woosley L. N., Castanheira M., Jones R. N. CEM-101 activity against Gram-positive organisms // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – T. 54, № 5. – C. 2182-7.
51. Kannan K., Vázquez-Laslop N., Mankin A. S. Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel // *Cell.* – 2012. – T. 151, № 3. – C. 508-20.
52. Kisselev L. L., Buckingham R. H. Translational termination comes of age // *Trends Biochem Sci.* – 2000. – T. 25, № 11. – C. 561-6.
53. Ito K., Uno M., Nakamura Y. A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA // *Nature.* – 2000. – T. 403, № 6770. – C. 680-4.
54. Karimi R., Pavlov M. Y., Buckingham R. H., Ehrenberg M. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation // *Mol Cell.* – 1999. – T. 3, № 5. – C. 601-9.
55. Kaji A., Kiel M. C., Hirokawa G., Muto A. R., Inokuchi Y., Kaji H. The fourth step of protein synthesis: disassembly of the posttermination complex is catalyzed by elongation factor G and ribosome recycling factor, a near-perfect mimic of tRNA // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* – 2001. – T. 66. – C. 515-29.
56. Spahn C. M., Prescott C. D. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus // *J Mol Med (Berl).* – 1996. – T. 74, № 8. – C. 423-39.
57. Brodersen D. E., Clemons W. M., Carter A. P., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit // *Cell.* – 2000. – T. 103, № 7. – C. 1143-54.
58. Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics // *Nature.* – 2000. – T. 407, № 6802. – C. 340-8.
59. Schlünzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria // *Nature.* – 2001. – T. 413, № 6858. – C. 814-21.
60. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance // *Nature.* – 2000. – T. 406, № 6797. – C. 775-81.
61. Wilson D. N. The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance // *mBio.* – 2016. – T. 7, № 3.
62. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B., Lawrence C. A., Collins J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell.* – 2007. – T. 130, № 5. – C. 797-810.
63. Davis B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides // *Microbiol Rev.* – 1987. – T. 51, № 3. – C. 341-50.
64. Bakker-Woudenberg I. A., van Vianen W., van Soolingen D., Verbrugh H. A., van Agtmael M. A. Antimycobacterial agents differ with respect to their bacteriostatic versus bactericidal activities in relation to time of exposure,

mycobacterial growth phase, and their use in combination // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2005. – T. 49, № 6. – C. 2387-98.

65. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death // *Cell.* – 2008. – T. 135, № 4. – C. 679-90.

66. Zimmermann R. A., Garvin R. T., Gorini L. Alteration of a 30S ribosomal protein accompanying the ram mutation in *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1971. – T. 68, № 9. – C. 2263-7.

67. Champney W. S. The other target for ribosomal antibiotics: inhibition of bacterial ribosomal subunit formation // *Infect Disord Drug Targets.* – 2006. – T. 6, № 4. – C. 377-90.

68. Siibak T., Peil L., Xiong L., Mankin A., Remme J., Tenson T. Erythromycin- and chloramphenicol-induced ribosomal assembly defects are secondary effects of protein synthesis inhibition // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – T. 53, № 2. – C. 563-71.

69. Reddish G. F. Methods of testing antiseptics // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* – 1929. – T. 14, № 7. – C. 649-658.

70. Osterman I. A., Komarova E. S., Shiryaev D. I., Korniltsev I. A., Khven I. M., Lukyanov D. A., Tashlitsky V. N., Serebryakova M. V., Efremenkova O. V., Ivanenkov Y. A., Bogdanov A. A., Sergiev P. V., Dontsova O. A. Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – T. 60, № 12. – C. 7481-7489.

71. Merino E., Yanofsky C. Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria // *Trends Genet.* – 2005. – T. 21, № 5. – C. 260-4.

72. Merino E., Jensen R. A., Yanofsky C. Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation // *Curr Opin Microbiol.* – 2008. – T. 11, № 2. – C. 78-86.

73. Zurawski G., Elseviers D., Stauffer G. V., Yanofsky C. Translational control of transcription termination at the attenuator of the *Escherichia coli* tryptophan operon // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1978. – T. 75, № 12. – C. 5988-92.

74. Radman M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis // *Basic Life Sci.* – 1975. – T. 5A. – C. 355-67.

75. Ушаков В. Ю. Sos-система репарации ДНК у бактерий // *Вестник ПГУ. Биология.* – 2010. – Т. 2.

76. Norman A., Hestbjerg Hansen L., Sørensen S. J. Construction of a ColD *cda* promoter-based SOS-green fluorescent protein whole-cell biosensor with higher sensitivity toward genotoxic compounds than constructs based on *recA*, *umuDC*, or *sulA* promoters // *Appl Environ Microbiol.* – 2005. – T. 71, № 5. – C. 2338-46.

77. Horwitz J. P. C. J., Curby R. J., Tomson A. J., Darooge M. A., Fisher B. E., Mauricio J., Klundt I. Substrates For Cytochemical Demonstration Of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-Beta-D-Glycopyranosides // *J Med Chem.* – 1964. – T. 7. – C. 574-5.

78. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science*. – 1994. – T. 263, № 5148. – C. 802-5.
79. Svetlov M. S., Kommer A., Kolb V. A., Spirin A. S. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family // *Protein Sci.* – 2006. – T. 15, № 2. – C. 242-7.
80. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K. A., Tomita M., Wanner B. L., Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection // *Mol Syst Biol.* – 2006. – T. 2. – C. 2006.0008.
81. Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M. M., Liu H., Ochabowicz A., Quan S., Pham V. C., Squires C. L., Murphy B. T., Mankin A. S. Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – T. 57, № 12. – C. 5994-6004.
82. Sulavik M. C., Houseweart C., Cramer C., Jiwani N., Murgolo N., Greene J., DiDomenico B., Shaw K. J., Miller G. H., Hare R., Shimer G. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – T. 45, № 4. – C. 1126-36.
83. Wu T., McCandlish A. C., Gronenberg L. S., Chng S. S., Silhavy T. J., Kahne D. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – T. 103, № 31. – C. 11754-9.
84. Sampson B. A., Misra R., Benson S. A. Identification and characterization of a new gene of *Escherichia coli* K-12 involved in outer membrane permeability // *Genetics.* – 1989. – T. 122, № 3. – C. 491-501.
85. Du D., Wang Z., James N. R., Voss J. E., Klimont E., Ohene-Agyei T., Venter H., Chiu W., Luisi B. F. Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump // *Nature*. – 2014. – T. 509. – C. 512–515.
86. Schreiber S. L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands // *Science*. – 1991. – T. 251, № 4991. – C. 283-7.
87. Sehgal S. N., Baker H., Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization // *J Antibiot (Tokyo)*. – 1975. – T. 28, № 10. – C. 727-32.
88. Andremont A., Gerbaud G., Courvalin P. Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in *Escherichia coli* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1986. – T. 29, № 3. – C. 515-8.
89. Wogan G. N., Hecht S. S., Felton J. S., Conney A. H., Loeb L. A. Environmental and chemical carcinogenesis // *Semin Cancer Biol.* – 2004. – T. 14, № 6. – C. 473-86.
90. Alberts A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin // *Am J Cardiol.* – 1988. – T. 62, № 15. – C. 10J-15J.
91. Brajtburg J., Powderly W. G., Kobayashi G. S., Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1990. – T. 34, № 2. – C. 183-8.

92. Russell J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force // *J Anim Sci.* – 1987. – T. 64, № 5. – C. 1519-25.
93. Huczyński A., Stefańska J., Przybylski P., Brzezinski B., Bartl F. Synthesis and antimicrobial properties of monensin A esters // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – T. 18, № 8. – C. 2585-9.
94. Quigley G. J., Wang A. H., Ughetto G., van der Marel G., van Boom J. H., Rich A. Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG) // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1980. – T. 77, № 12. – C. 7204-8.
95. Fornari F. A., Randolph J. K., Yalowich J. C., Ritke M. K., Gewirtz D. A. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells // *Mol Pharmacol.* – 1994. – T. 45, № 4. – C. 649-56.
96. Goldman R. A., Hasan T., Hall C. C., Strycharz W. A., Cooperman B. S. Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis // *Biochemistry.* – 1983. – T. 22, № 2. – C. 359-68.
97. Andrews J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations // *J Antimicrob Chemother.* – 2001. – T. 48 Suppl 1. – C. 5-16.
98. Drautz H., Reuschenbach P., Zähler H., Rohr J., Zeeck A. Metabolic products of microorganisms. 225. Elloramycin, a new anthracycline-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation, characterization, structure and biological properties // *J Antibiot (Tokyo).* – 1985. – T. 38, № 10. – C. 1291-301.
99. Silver L., Bostian K. Screening of natural products for antimicrobial agents // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 1990. – T. 9, № 7. – C. 455-61.
100. U. V. Tetracyclines: chemical aspects and some structure—activity relationships // *Book Tetracyclines: chemical aspects and some structure—activity relationships / Editor.* – Amsterdam: New Trends in Antibiotics: Research and Therapy, 1981.
101. Col N. F., O'Connor R. W. Estimating worldwide current antibiotic usage: report of Task Force 1 // *Rev Infect Dis.* – 1987. – T. 9 Suppl 3. – C. S232-43.
102. Jonas M., Cunha B. A. Minocycline // *Ther Drug Monit.* – 1982. – T. 4, № 2. – C. 137-45.
103. Chopra I., Howe T. G., Linton A. H., Linton K. B., Richmond M. H., Speller D. C. The tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980s // *J Antimicrob Chemother.* – 1981. – T. 8, № 1. – C. 5-21.
104. Levy S. B. Evolution and spread of tetracycline resistance determinants // *J Antimicrob Chemother.* – 1989. – T. 24, № 1. – C. 1-3.
105. Tritton T. R. Ribosome-tetracycline interactions // *Biochemistry.* – 1977. – T. 16, № 18. – C. 4133-8.
106. Rasmussen B., Noller H. F., Daubresse G., Oliva B., Misulovin Z., Rothstein D. M., Ellestad G. A., Gluzman Y., Tally F. P., Chopra I. Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1991. – T. 35, № 11. – C. 2306-11.

107. Pioletti M., Schlünzen F., Harms J., Zarivach R., Glühmann M., Avila H., Bashan A., Bartels H., Auerbach T., Jacobi C., Hartsch T., Yonath A., Franceschi F. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3 // *EMBO J.* – 2001. – T. 20, № 8. – C. 1829-39.
108. Blanchard S. C., Gonzalez R. L., Kim H. D., Chu S., Puglisi J. D. tRNA selection and kinetic proofreading in translation // *Nat Struct Mol Biol.* – 2004. – T. 11, № 10. – C. 1008-14.
109. van den Bogert C., Kroon A. M. Tissue distribution and effects on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats // *Biochem Pharmacol.* – 1981. – T. 30, № 12. – C. 1706-9.
110. Riesbeck K., Bredberg A., Forsgren A. Ciprofloxacin does not inhibit mitochondrial functions but other antibiotics do // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1990. – T. 34, № 1. – C. 167-9.
111. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2001. – T. 65, № 2. – C. 232-60 ; second page, table of contents.
112. Salyers A. A., Speer B. S., Shoemaker N. B. New perspectives in tetracycline resistance // *Mol Microbiol.* – 1990. – T. 4, № 1. – C. 151-6.
113. Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1998. – T. 42, № 7. – C. 1702-5.
114. Trieber C. A., Taylor D. E. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline // *J Bacteriol.* – 2002. – T. 184, № 8. – C. 2131-40.
115. Gerrits M. M., de Zoete M. R., Arents N. L., Kuipers E. J., Kusters J. G. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2002. – T. 46, № 9. – C. 2996-3000.
116. CALENDI E., DIMARCO A., REGGIANI M., SCARPINATO B., VALENTINI L. ON PHYSICO-CHEMICAL INTERACTIONS BETWEEN DAUNOMYCIN AND NUCLEIC ACIDS // *Biochim Biophys Acta.* – 1965. – T. 103. – C. 25-49.
117. Waring M. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation // *J Mol Biol.* – 1970. – T. 54, № 2. – C. 247-79.
118. Pigram W. J., Fuller W., Hamilton L. D. Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA // *Nat New Biol.* – 1972. – T. 235, № 53. – C. 17-9.
119. Yue S., Motamedi H., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R. Anthracycline metabolites of tetracenomycin C-nonproducing *Streptomyces glaucescens* mutants // *J Bacteriol.* – 1986. – T. 167, № 2. – C. 581-6.
120. Lazar G., Zahner H., Breiding S., Damberg M., Zeeck A. 3-Demethoxy-3-ethoxy-tetracenomycin C // *J Antibiot (Tokyo).* – 1981. – T. 34, № 8. – C. 1067-8.

121. Misumi M., Yamaki H., Akiyama T., Tanaka N. Mechanism of action of aclacinomycin A II. The interaction with DNA and with tubulin // *J Antibiot (Tokyo)*. – 1979. – T. 32, № 1. – C. 48-52.
122. Bibb M. J., Biró S., Motamedi H., Collins J. F., Hutchinson C. R. Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens* *tcmI* genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis // *EMBO J*. – 1989. – T. 8, № 9. – C. 2727-36.
123. Bao W., Wendt-Pienkowski E., Hutchinson C. R. Reconstitution of the iterative type II polyketide synthase for tetracenomycin F2 biosynthesis // *Biochemistry*. – 1998. – T. 37, № 22. – C. 8132-8.
124. Summers R. G., Wendt-Pienkowski E., Motamedi H., Hutchinson C. R. Nucleotide sequence of the *tcmII-tcmIV* region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the *tcmN* gene encodes a multifunctional cyclase-dehydratase-O-methyl transferase // *J Bacteriol*. – 1992. – T. 174, № 6. – C. 1810-20.
125. Summers R. G., Wendt-Pienkowski E., Motamedi H., Hutchinson C. R. The *tcmVI* region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* encodes the tetracenomycin F1 monooxygenase, tetracenomycin F2 cyclase, and, most likely, a second cyclase // *J Bacteriol*. – 1993. – T. 175, № 23. – C. 7571-80.
126. Shen B., Hutchinson C. R. Tetracenomycin F2 cyclase: intramolecular aldol condensation in the biosynthesis of tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens* // *Biochemistry*. – 1993. – T. 32, № 41. – C. 11149-54.
127. Thompson T. B., Katayama K., Watanabe K., Hutchinson C. R., Rayment I. Structural and functional analysis of tetracenomycin F2 cyclase from *Streptomyces glaucescens*. A type II polyketide cyclase // *J Biol Chem*. – 2004. – T. 279, № 36. – C. 37956-63.
128. Shen B., Hutchinson C. R. Tetracenomycin F1 monooxygenase: oxidation of a naphthacene to a naphthacenequinone in the biosynthesis of tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens* // *Biochemistry*. – 1993. – T. 32, № 26. – C. 6656-63.
129. Ames B. D., Korman T. P., Zhang W., Smith P., Vu T., Tang Y., Tsai S. C. Crystal structure and functional analysis of tetracenomycin ARO/CYC: implications for cyclization specificity of aromatic polyketides // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – T. 105, № 14. – C. 5349-54.
130. Fu H., Alvarez M. A., Khosla C., Bailey J. E. Engineered biosynthesis of novel polyketides: regiospecific methylation of an unnatural substrate by the *tcmO* O-methyltransferase // *Biochemistry*. – 1996. – T. 35, № 21. – C. 6527-32.
131. Decker H., Motamedi H., Hutchinson C. R. Nucleotide sequences and heterologous expression of *tcmG* and *tcmP*, biosynthetic genes for tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens* // *J Bacteriol*. – 1993. – T. 175, № 12. – C. 3876-86.
132. Shen B., Hutchinson C. R. Triple hydroxylation of tetracenomycin A2 to tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*. Overexpression of the *tcmG* gene in *Streptomyces lividans* and characterization of the tetracenomycin A2 oxygenase // *J Biol Chem*. – 1994. – T. 269, № 48. – C. 30726-33.

133. Rafanan E. R., Hutchinson C. R., Shen B. Triple hydroxylation of tetracenomycin A2 to tetracenomycin C involving two molecules of O(2) and one molecule of H(2)O // *Org Lett.* – 2000. – T. 2, № 20. – C. 3225-7.
134. Beynon J., Rafanan E. R., Shen B., Fisher A. J. Crystallization and preliminary X-ray analysis of tetracenomycin A2 oxygenase: a flavoprotein hydroxylase involved in polyketide biosynthesis // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2000. – T. 56, № Pt 12. – C. 1647-51.
135. Hutchinson C. R. Biosynthetic Studies of Daunorubicin and Tetracenomycin C // *Chem Rev.* – 1997. – T. 97, № 7. – C. 2525-2536.
136. Parenti F., Ciabatti R., Cavalleri B., Kettenring J. Ramoplanin: a review of its discovery and its chemistry // *Drugs Exp Clin Res.* – 1990. – T. 16, № 9. – C. 451-5.
137. McCafferty D. G., Cudic P., Frankel B. A., Barkallah S., Kruger R. G., Li W. Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics // *Biopolymers.* – 2002. – T. 66, № 4. – C. 261-84.
138. Parenti F. Structure and mechanism of action of teicoplanin // *J Hosp Infect.* – 1986. – T. 7 Suppl A. – C. 79-83.
139. Coronelli C., Gallo G. G., Cavalleri B. Teicoplanin: chemical, physico-chemical and biological aspects // *Farmaco Sci.* – 1987. – T. 42, № 10. – C. 767-86.
140. Athanasellis G., Igglessi-Markopoulou O., Markopoulos J. Tetramic and tetrionic acids as scaffolds in bioinorganic and bioorganic chemistry // *Bioinorg Chem Appl.* – 2010. – C. 315056.
141. Tsunematsu Y., Fukutomi M., Saruwatari T., Noguchi H., Hotta K., Tang Y., Watanabe K. Elucidation of pseurotin biosynthetic pathway points to trans-acting C-methyltransferase: generation of chemical diversity // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2014. – T. 53, № 32. – C. 8475-9.
142. Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – T. 97, № 12. – C. 6640-5.
143. Wishart D. S., Bigam C. G., Holm A., Hodges R. S., Sykes B. D. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects // *J Biomol NMR.* – 1995. – T. 5, № 1. – C. 67-81.
144. Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G. W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J Biomol NMR.* – 1995. – T. 6, № 3. – C. 277-93.
145. Lee W., Tonelli M., Markley J. L. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy // *Bioinformatics.* – 2015. – T. 31, № 8. – C. 1325-7.
146. Kalinina M. A., Skvortsov D. A., Rubtsova M. P., Komarova E. S., Dontsova O. A. Cytotoxicity Test Based on Human Cells Labeled with Fluorescent Proteins: Fluorimetry, Photography, and Scanning for High-Throughput Assay // *Mol Imaging Biol.* – 2018. – T. 20, № 3. – C. 368-377.
147. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods.* – 1983. – T. 65, № 1-2. – C. 55-63.

148. Orelle C., Szal T., Klepacki D., Shaw K. J., Vázquez-Laslop N., Mankin A. S. Identifying the targets of aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors by primer extension inhibition // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – T. 41, № 14. – C. e144.
149. Maggiora G., Vogt M., Stumpfe D., Bajorath J. Molecular similarity in medicinal chemistry // *J Med Chem.* – 2014. – T. 57, № 8. – C. 3186-204.
150. 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 F. N., Sun C. H. Diversity, Novelty, and Antimicrobial Activity of Endophytic Actinobacteria From Mangrove Plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China // *Front Microbiol.* – 2018. – T. 9. – C. 868.
151. Li F., Liu S., Lu Q., Zheng H., Osterman I. A., Lukyanov D. A., Sergiev P. V., Dontsova O. A., Ye J., Huang D., Sun C. Studies on Antibacterial Activity and Diversity of Cultivable Actinobacteria Isolated from Mangrove Soil in Futian and Maowehai of China // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2019. – T. 2019. – C. 3476567.
152. Jiang Z. K., 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., Sun C. H. Beilunmycin, a new virginiamycins antibiotic from mangrove-derived // *J Asian Nat Prod Res.* – 2021. – T. 23, № 10. – C. 992-1000.
153. Liu S., Wang T., Lu Q., Li F., Wu G., Jiang Z., Habden X., Liu L., Zhang X., Lukianov D. A., Osterman I. A., Sergiev P. V., Dontsova O. A., Sun C. Bioprospecting of Soil-Derived Actinobacteria Along the Alar-Hotan Desert Highway in the Taklamakan Desert // *Front Microbiol.* – 2021. – T. 12. – C. 604999.
154. Ortseifen V., Kalinowski J., Pühler A., Rückert C. The complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) carrying gene clusters for the biosynthesis of tetracenomycin C, 5'-hydroxy streptomycin, and acarbose // *J Biotechnol.* – 2017. – T. 262. – C. 84-88.
155. Rohr J., Zeeck A. Structure-activity relationships of elloramycin and tetracenomycin C // *J Antibiot (Tokyo).* – 1990. – T. 43, № 9. – C. 1169-78.
156. Egert E., Noltemeyer M., Siebers J., Rohr J., Zeeck A. The structure of tetracenomycin C // *J Antibiot (Tokyo).* – 1992. – T. 45, № 7. – C. 1190-2.
157. Agudelo D., Bourassa P., Bérubé G., Tajmir-Riahi H. A. Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity // *J Photochem Photobiol B.* – 2016. – T. 158. – C. 274-9.
158. Pato M. L. Tetracycline inhibits propagation of deoxyribonucleic acid replication and alters membrane properties // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1977. – T. 11, № 2. – C. 318-23.
159. Vester B., Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – T. 45, № 1. – C. 1-12.
160. Jenner L., Starosta A. L., Terry D. S., Mikolajka A., Filonava L., Yusupov M., Blanchard S. C., Wilson D. N., Yusupova G. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – T. 110, № 10. – C. 3812-6.
161. Polikanov Y. S., Starosta A. L., Juette M. F., Altman R. B., Terry D. S., Lu W., Burnett B. J., Dinos G., Reynolds K. A., Blanchard S. C., Steitz T. A., Wilson D. N.



Distinct tRNA Accommodation Intermediates Observed on the Ribosome with the Antibiotics Hygromycin A and A201A // *Mol Cell.* – 2015. – T. 58, № 5. – C. 832-44.

162. Liu B., Tan Y., Gan M. L., Zhou H. X., Wang Y. G., Ping Y. H., Li B., Yang Z. Y., Xiao C. L. [Identification of tetracenomycin X from a marine-derived *Saccharothrix* sp. guided by genes sequence analysis] // *Yao Xue Xue Bao.* – 2014. – T. 49, № 2. – C. 230-6.

163. Gan M., Liu B., Tan Y., Wang Q., Zhou H., He H., Ping Y., Yang Z., Wang Y., Xiao C. Saccharothrixones A-D, Tetracenomycin-Type Polyketides from the Marine-Derived Actinomycete *Saccharothrix* sp. 10-10 // *J Nat Prod.* – 2015. – T. 78, № 9. – C. 2260-5.

164. Adinarayana G., Venkateshan M. R., Bapiraju V. V., Sujatha P., Premkumar J., Ellaiah P., Zeeck A. [Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium] // *Bioorg Khim.* – 2006. – T. 32, № 3. – C. 328-34.

165. Akulich K. A., Andreev D. E., Terenin I. M., Smirnova V. V., Anisimova A. S., Makeeva D. S., Arkhipova V. I., Stolboushkina E. A., Garber M. B., Prokofjeva M. M., Spirin P. V., Prassolov V. S., Shatsky I. N., Dmitriev S. E. Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes // *Sci Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 37905.

166. Terenin I. M., Andreev D. E., Dmitriev S. E., Shatsky I. N. A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – T. 41, № 3. – C. 1807-16.

167. Metelev M., Osterman I. A., Ghilarov D., Khabibullina N. F., Yakimov A., Shabalin K., Utkina I., Travin D. Y., Komarova E. S., Serebryakova M., Artamonova T., Khodorkovskii M., Konevega A. L., Sergiev P. V., Severinov K., Polikanov Y. S. Klebsazolicin inhibits 70S ribosome by obstructing the peptide exit tunnel // *Nat Chem Biol.* – 2017. – T. 13, № 10. – C. 1129-1136.

168. Vázquez-Laslop N., Mankin A. S. How Macrolide Antibiotics Work // *Trends Biochem Sci.* – 2018. – T. 43, № 9. – C. 668-684.

169. Arenz S., Ramu H., Gupta P., Berninghausen O., Beckmann R., Vázquez-Laslop N., Mankin A. S., Wilson D. N. Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide // *Nat Commun.* – 2014. – T. 5. – C. 3501.

170. Arenz S., Bock L. V., Graf M., Innis C. A., Beckmann R., Grubmüller H., Vaiana A. C., Wilson D. N. A combined cryo-EM and molecular dynamics approach reveals the mechanism of ErmBL-mediated translation arrest // *Nat Commun.* – 2016. – T. 7. – C. 12026.

171. Guilfoile P. G., Hutchinson C. R. Sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces glaucescens* tcmAR tetracenomycin C resistance and repressor gene loci // *J Bacteriol.* – 1992. – T. 174, № 11. – C. 3651-8.

172. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications // *Clin Infect Dis.* – 2002. – T. 34, № 4. – C. 482-92.

173. Alferova V. A., Maviza T. P., Biryukov M. V., Zakalyukina Y. V., Lukianov D. A., Skvortsov D. A., Vasilyeva L. A., Tashlitsky V. N., Polshakov V. I., Sergiev

- P. V., Korshun V. A., Osterman I. A. Biological evaluation and spectral characterization of a novel tetracenomycin X congener // *Biochimie*. – 2022. – T. 192. – C. 63-71.
174. Oren A., Garrity G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2021. – T. 71, № 10.
175. Parenti F., Coronelli C. Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics // *Annu Rev Microbiol*. – 1979. – T. 33. – C. 389-411.
176. Parenti F., Beretta G., Berti M., Arioli V. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties // *J Antibiot (Tokyo)*. – 1978. – T. 31, № 4. – C. 276-83.
177. Gregory S. T., Connetti J. L., Carr J. F., Jogl G., Dahlberg A. E. Phenotypic interactions among mutations in a *Thermus thermophilus* 16S rRNA gene detected with genetic selections and experimental evolution // *J Bacteriol*. – 2014. – T. 196, № 21. – C. 3776-83.
178. Vallabhaneni H., Farabaugh P. J. Accuracy modulating mutations of the ribosomal protein S4-S5 interface do not necessarily destabilize the rps4-rps5 protein-protein interaction // *RNA*. – 2009. – T. 15, № 6. – C. 1100-9.
179. Björkman J., Samuelsson P., Andersson D. I., Hughes D. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium* // *Mol Microbiol*. – 1999. – T. 31, № 1. – C. 53-8.
180. Agarwal D., Kamath D., Gregory S. T., O'Connor M. Modulation of decoding fidelity by ribosomal proteins S4 and S5 // *J Bacteriol*. – 2015. – T. 197, № 6. – C. 1017-25.
181. Maisnier-Patin S., Berg O. G., Liljas L., Andersson D. I. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* // *Mol Microbiol*. – 2002. – T. 46, № 2. – C. 355-66.
182. McClory S. P., Leisring J. M., Qin D., Fredrick K. Missense suppressor mutations in 16S rRNA reveal the importance of helices h8 and h14 in aminoacyl-tRNA selection // *RNA*. – 2010. – T. 16, № 10. – C. 1925-34.
183. Florin T., Maracci C., Graf M., Karki P., Klepacki D., Berninghausen O., Beckmann R., Vázquez-Laslop N., Wilson D. N., Rodnina M. V., Mankin A. S. An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome // *Nat Struct Mol Biol*. – 2017. – T. 24, № 9. – C. 752-757.
184. Kramer E. B., Farabaugh P. J. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition // *RNA*. – 2007. – T. 13, № 1. – C. 87-96.
185. Demirci H., Murphy F., Murphy E., Gregory S. T., Dahlberg A. E., Jogl G. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code // *Nat Commun*. – 2013. – T. 4. – C. 1355.
186. DAVIES J., GILBERT W., GORINI L. STREPTOMYCIN, SUPPRESSION, AND THE CODE // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1964. – T. 51. – C. 883-90.
187. Demirci H., Wang L., Murphy F. V., Murphy E. L., Carr J. F., Blanchard S. C., Jogl G., Dahlberg A. E., Gregory S. T. The central role of protein S12 in organizing

- the structure of the decoding site of the ribosome // RNA. – 2013. – T. 19, № 12. – C. 1791-801.
188. Rosset R., Gorini L. A ribosomal ambiguity mutation // J Mol Biol. – 1969. – T. 39, № 1. – C. 95-112.
189. Bjare U., Gorini L. Drug dependence reversed by a ribosomal ambiguity mutation, ram, in Escherichia coli // J Mol Biol. – 1971. – T. 57, № 3. – C. 423-35.
190. Hasenbank R., Guthrie C., Stöffler G., Wittmann H. G., Rosen L., Apirion D. Electrophoretic and immunological studies on ribosomal proteins of 100 Escherichia coli revertants from streptomycin dependence // Mol Gen Genet. – 1973. – T. 127, № 1. – C. 1-18.
191. Hoffer E. D., Maehigashi T., Fredrick K., Dunham C. M. Ribosomal ambiguity (ram) mutations promote the open (off) to closed (on) transition and thereby increase miscoding // Nucleic Acids Res. – 2019. – T. 47, № 3. – C. 1557-1563.
192. McClory S. P., Devaraj A., Fredrick K. Distinct functional classes of ram mutations in 16S rRNA // RNA. – 2014. – T. 20, № 4. – C. 496-504.
193. Fagan C. E., Dunkle J. A., Maehigashi T., Dang M. N., Devaraj A., Miles S. J., Qin D., Fredrick K., Dunham C. M. Reorganization of an intersubunit bridge induced by disparate 16S ribosomal ambiguity mutations mimics an EF-Tu-bound state // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – T. 110, № 24. – C. 9716-21.

## 7. Приложение

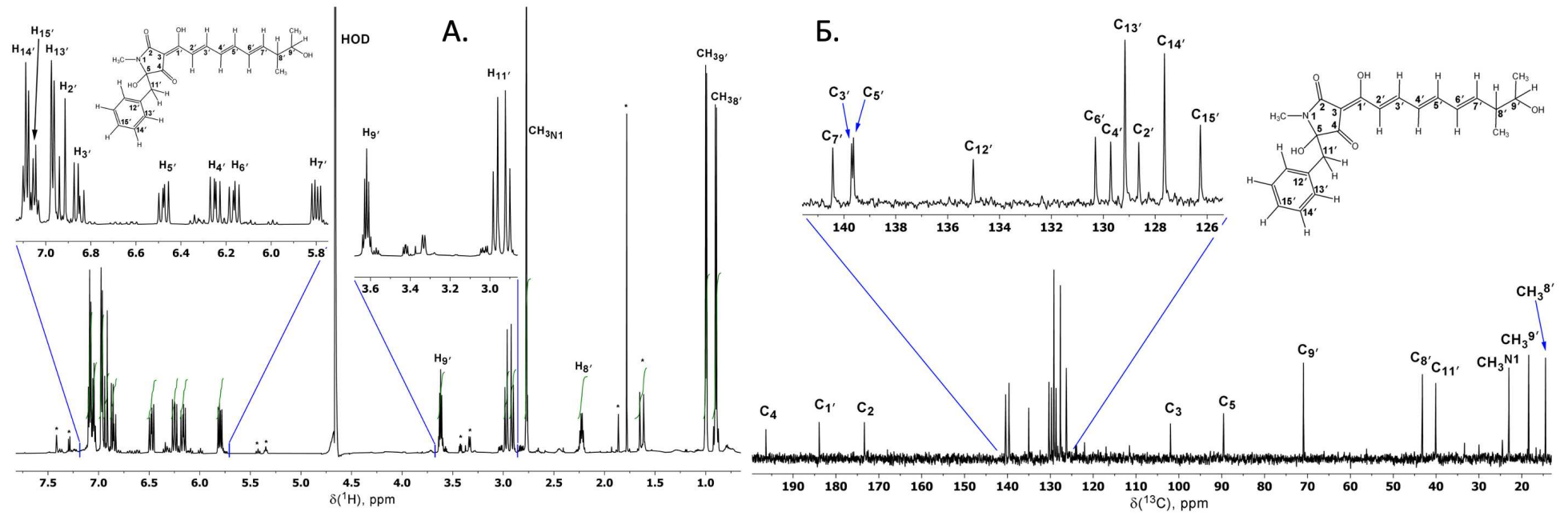


Рис. 66. Данные ЯМР спектроскопии. А - спектр 1D ЯМР  $^1\text{H}$  соединения, Б - спектр  $^{13}\text{C}$ .

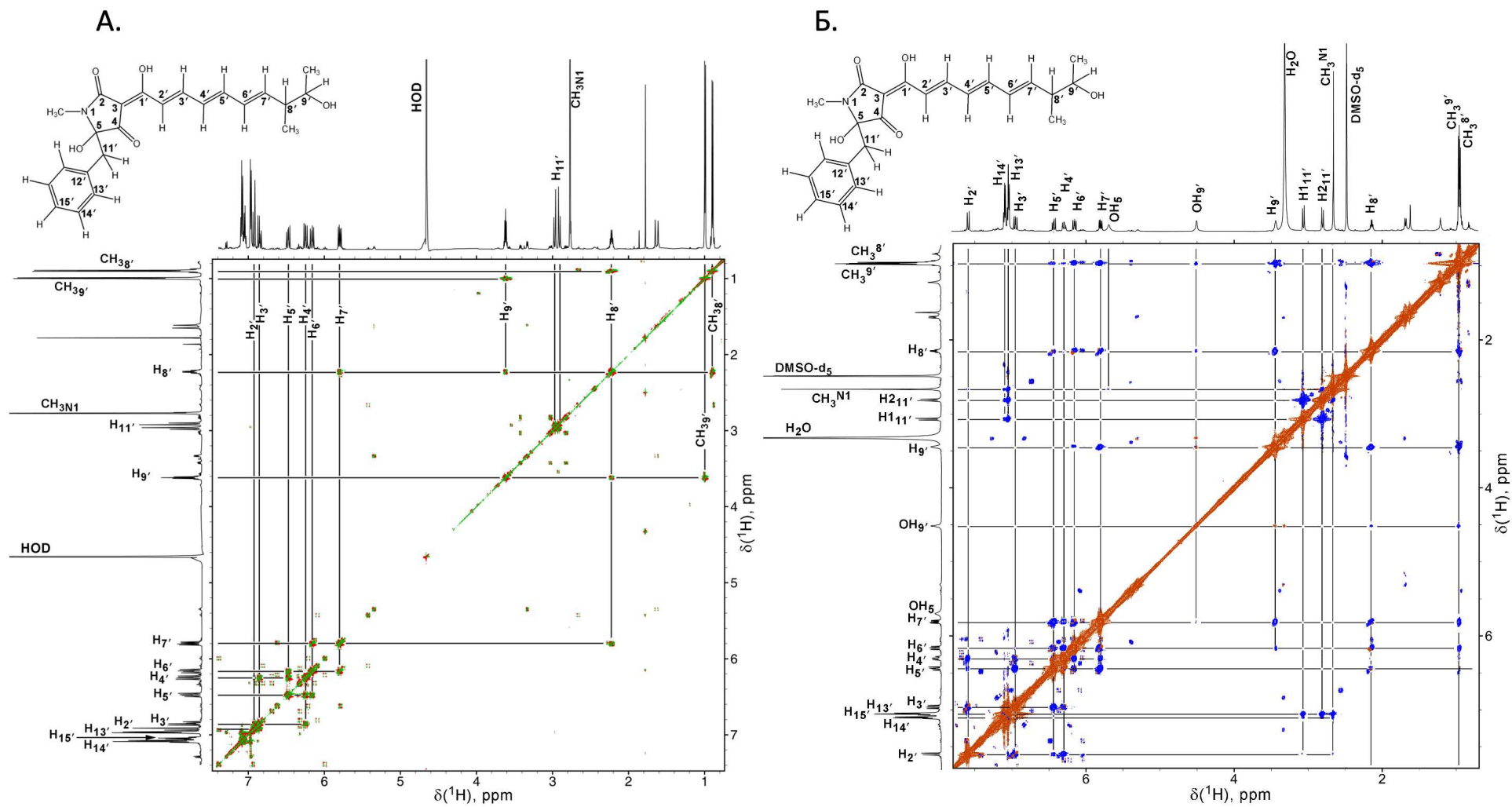


Рис. 67. Данные ЯМР спектроскопии. В -  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY, Г -  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY.

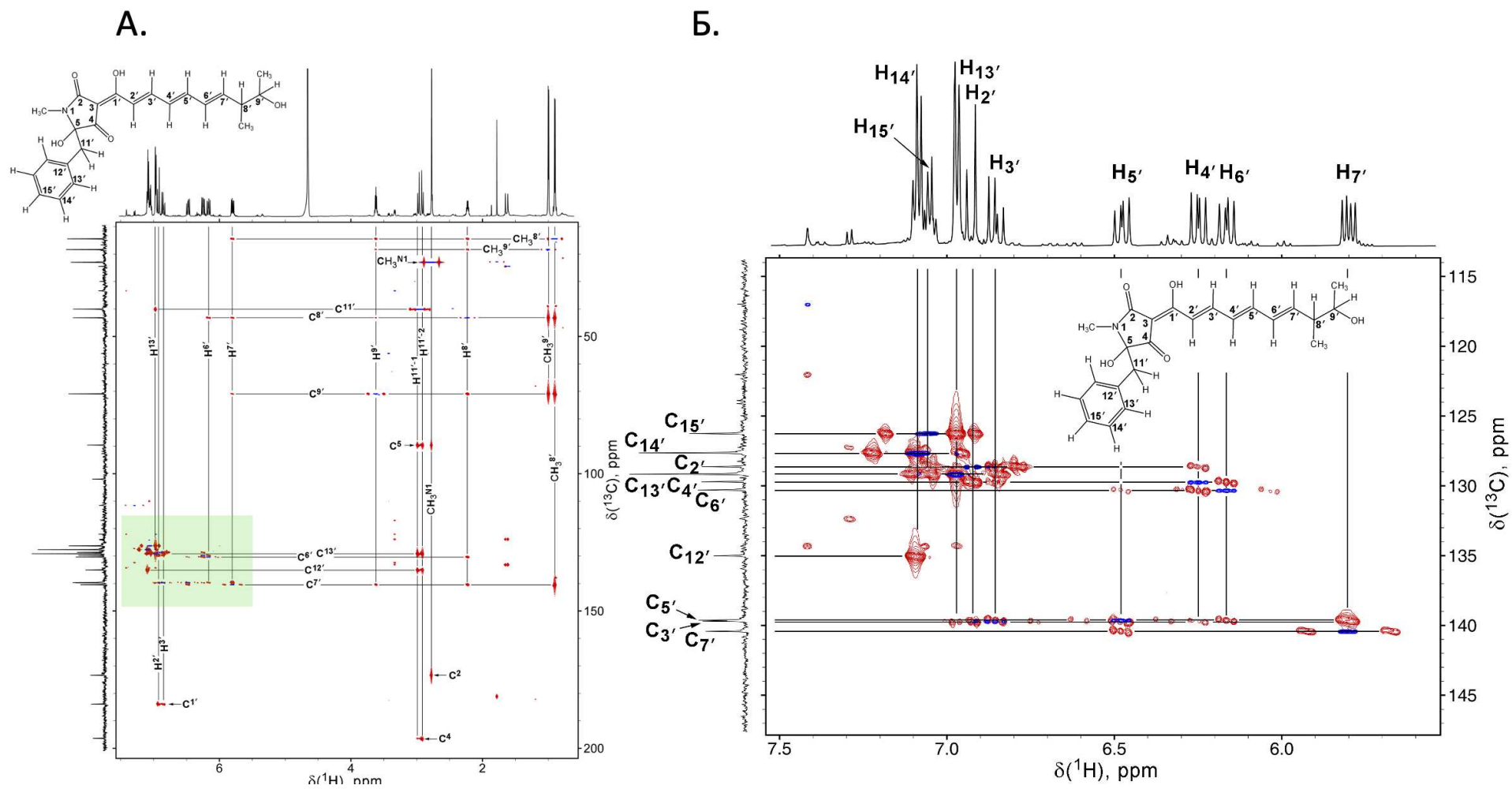


Рис. 68. Данные ЯМР спектроскопии. А -  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC, Б -  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMQC.

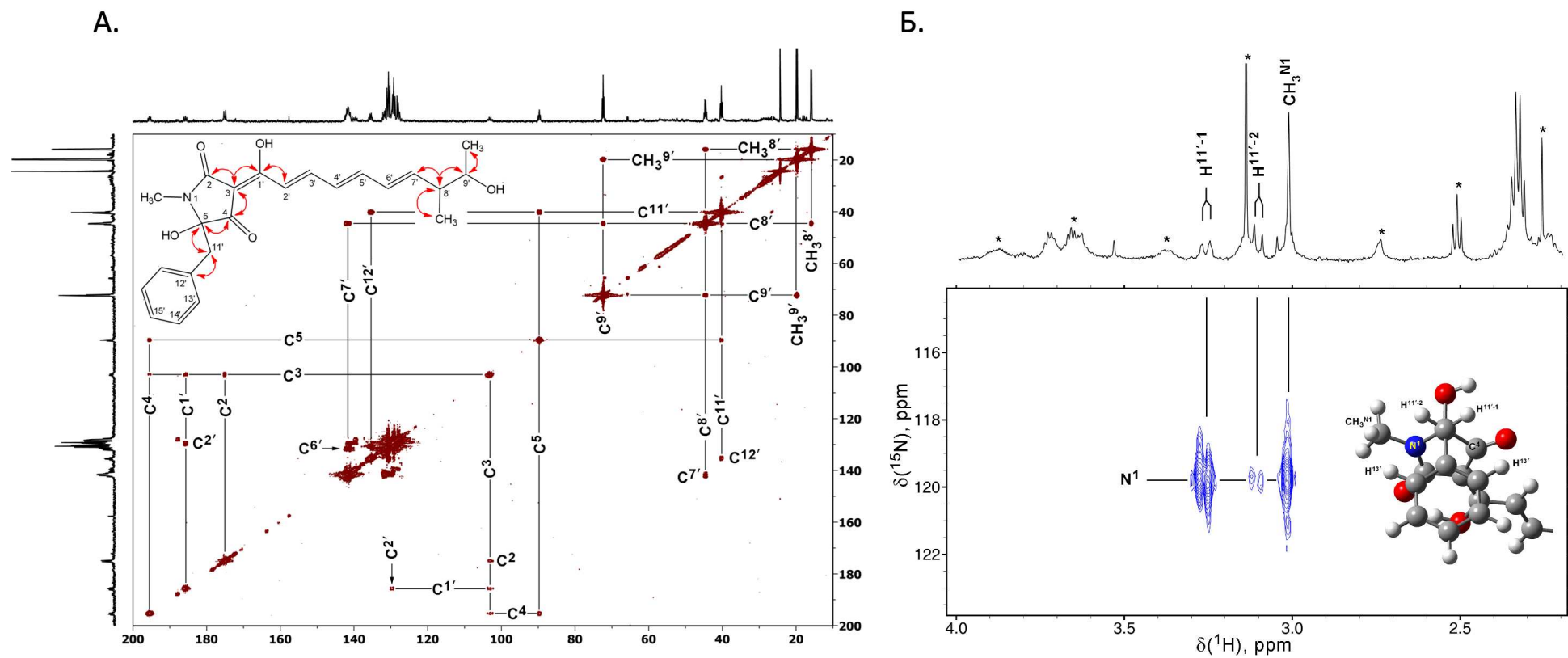


Рис. 69. Данные ЯМР спектроскопии. А -  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  НМВС спектр, измеренный на  $^{15}\text{N}$ -обогащенном аураланине, Б -  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  COSY, измеренным на соединении, обогащенном изотопом  $^{13}\text{C}$ .