

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Марина Валерия Ивановна

**Новые аспекты действия антибиотиков, связывающихся с 50S субъединицей
рибосом**

1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научные руководители:
кандидат химических наук
Лукьянов Д. А;
профессор, член-корреспондент
РАН Сергиев П.В.

Москва 2025

Оглавление

Список сокращений	6
Введение	8
Актуальность проблемы	8
Цель и задачи	9
Объект исследования	9
Предмет исследования	9
Научная новизна исследования	10
Научная и практическая значимость исследования	10
Методология диссертационного исследования	11
Основные положения, выносимые на защиту	11
Степень достоверности результатов	11
Апробация работы	12
Публикации	12
Личный вклад автора	14
Структура и объём диссертации	14
Обзор литературы	15
1. Методы изучения ингибиторов биосинтеза белка	15
1.0 Трансляция в прокариотических клетках	15
1.1 Детекция ингибиторов биосинтеза белка с помощью репортерных систем и <i>in vitro</i> трансляции	18
1.2 Изучение трансляционных событий и механизмов действия антибиотиков, ингибирующих биосинтез белка, с помощью toe-print анализа	24
1.3 Изучение трансляции кинетическими методами	26
1.4 Использование флуоресцентных меток для изучения биосинтеза белка	29
1.5 Использование метода рибосомного профилирования (ribosome profiling) для изучения трансляции и котрансляционных событий	33
BODIPY метка	35
2.0 Основная информация, физико-химические свойства, путь синтеза	36

2.1 Разнообразие BODIPY красителей, их использование в биомедицине и лабораторных исследованиях	37
Материалы и методы	44
1. Используемое оборудование	44
2. Реактивы и биопрепараты	44
3. Буферы и растворы	44
4. Используемые в работе бактериальные штаммы и клеточные линии	45
5. Отбор устойчивых клонов	46
6. Получение матриц ДНК для BODIPY-системы	46
7. <i>In vitro</i> трансляция с использованием системы из чистых компонентов (PURExpress kit)	48
8. Детекция пептидов в геле	49
9. Культивирование, изоляция и очистка цистоцина	49
10. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК)	50
11. Различные варианты <i>in vitro</i> трансляций	50
11.1 <i>In vitro</i> трансляция в бесклеточной системе на основе лизата <i>E. coli</i>	50
11.2 <i>In vitro</i> трансляция в системе из чистых компонентов	51
11.3 <i>In vitro</i> трансляция в системе на основе экстрактов клеток HEK293T	51
11. 4 <i>In vitro</i> трансляции «канонических» и «безлидерных» мРНК	52
12. Профилирование рибосом в градиенте сахарозы	55
13. MTT-тест на цитотоксичность	55
14. Toe-print анализ	55
15. Анализ механизма действия антибиотиков с использованием двойной репортерной системы DualRep2	58
Результаты и обсуждение	59
Часть 1. Создание BODIPY-системы	59
1.0 Введение	59
1.1 Визуализация коротких пептидов длиной от 1 до 7 аминокислот в денатурирующем РНК ПААГ с мочевиной	60
1.2 Время синтеза продукта в системе	61

1.3 Способы гидролиза эфирной связи для визуализации пептидных продуктов, меченные BODIPY	61
1.4 Верификация продуктов синтеза при помощи РНК ПААГ	63
1.5 В BODIPY системе возможно визуализировать короткие пептиды, содержащие отличные от фенилаланина аминокислоты	65
1.6 Возможность изучения терминационных событий с использованием BODIPY системы	67
1.7 Использование разделения BODIPY-меченные пептидов для изучения ингибиторов трансляции	69
Часть 2. Цистоцин и пуромицин	72
2.0 Введение	72
2.1 Культивация штамма, выделение и очистка цистоцина	74
2.2 Анализ механизма действия цистоцина с использованием двойной репортерной системы DualRep2	74
2.3 Сравнение МИК (минимальной ингибирующей концентрации) для пуромицина и цистоцина на различных бактериальных штаммах	75
2.4 Сравнение влияния пуромицина и цистоцина на прокариотическую и эукариотическую трансляции <i>in vitro</i>	77
2.5 Сравнение механизма действия пуромицина и цистоцина с использованием BODIPY-системы	78
2.6 Сравнение механизмов действия пуромицина и цистоцина toe-print анализом	80
Часть 3. Терморубин	83
3.0 Введение	83
3.1 Влияние терморубина на прокариотические клетки <i>in vivo</i>, а также <i>in vitro</i> трансляцию в системе на основе лизатов <i>E. coli</i> или системе из очищенных компонентов	85
3.2 Отбор устойчивых к терморубину клонов	89
3.3 Изучение механизма действия терморубина с использованием <i>in vitro</i> методов	90
Выводы	108
Заключение	109
Благодарности	110
Список литературы	111
Приложение	122

Приложение 1	122
Приложение 2	125
Приложение 3	131

Список сокращений

70S IC – инициаторный рибосомный комплекс 70S
BPy – BODIPY метка
Cip – ципрофлоксацин
Cst – цистоцин
EF-G – элонгационный фактор G
EF-Tu – элонгационный фактор Tu
Ery – эритромицин
FRET – Förster resonance energy transfer – фёрстеровский перенос энергии
GFP – green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок
HEK – human embryonic kidney - клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека
IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования
IFs – факторы инициации трансляции (IF1, IF2, IF3)
IRES – внутренний сайт посадки рибосомы
LB – лизогенный бульон;
Lev – левофлаксацин
LSU – большая субъединица рибосомы
MTT – метод оценки токсичности вещества на клетки
NGS – секвенирование нового поколения
NPET – рибосомный туннель
Puro – пуромицин
RFP – red fluorescent protein – красный флуоресцентный белок
RFs – факторы терминации трансляции (RF1, RF2)
RRF – фактор рециклинга рибосом
SD – Шайна-Дальгарно последовательность
SSU – малая субъединица рибосомы
THR – терморубин
3'-HTO – 3'-нетранслируемая область
5'-HTO – 5'-нетранслируемая область
аа-тРНК – аминоацилированная тРНК
ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК – комплементарная ДНК
Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОТ – обратная транскриптаза

ПААГ – полиакриламидный гель

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФБ – фотоакустическая биовизуализация

ФТ – фототермическая терапия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Введение

Актуальность проблемы

Начиная с античных времен, египтяне и греки использовали целебные настои и травы, в которых содержались антибиотические вещества, для лечения различных заболеваний. Однако представление о таких соединениях («антибиотиках») появилось только в конце XIX–начале XX века, после серии экспериментов, во главе которых стоит открытие А. Флемингом пенициллина в 1929 году [1]. Сам же термин «антибиотик» был введен Ваксманом в 1947 году и обозначал «химическое вещество, продуцируемое микроорганизмами, способное уничтожать или подавлять рост бактериальных клеток» [2]. На сегодняшний день, все антибиотики по происхождению можно разделить на естественные, полусинтетические и синтетические, а по механизму действия на бактерицидные (вызывают гибель бактерий) и бактериостатические (ингибируют рост и размножение) [3].

Несмотря на большое разнообразие применяемых антибиотических веществ, перед человечеством стоит большая проблема: развитие лекарственной устойчивости бактерий (резистентности). По данным Всемирной Организации Здравоохранения, смертность от бактериальных инфекций к 2050 году вырастет в 10 раз и достигнет 10 миллионов в год [4]. Поэтому, поиск новых антибактериальных веществ является крайне актуальной задачей.

Одним из ключевых моментов для разработки и использования в фармации антибиотических препаратов служит понимание механизма их действия [5]. На данный момент существует несколько систем для верификации и детерминации механизма действия антибактериальных соединений, описанных в «Обзоре литературы», однако у каждого метода есть ряд своих ограничений.

В данной работе разработан новый подход к изучению антибиотиков – BODIPY-система трансляции – с помощью которого были охарактеризованы механизмы действия для двух антибиотиков: терморубина (ингибитора элонгации и/или терминации трансляции, а не инициации, как ранее предполагалось [6]) и цистоцина (малоизученного антибиотика, структурно похожего на пуромицин). Показано, что BODIPY метод позволяет изучать трансляционные события (инициацию, пептидилтрансферазную реакцию, транслокацию и терминацию трансляции) по отдельности, используя стандартное лабораторное оборудование и электрофорез в полиакриламидном геле с мочевиной, обычно используемом для разделения РНК в денатурирующих условиях (ПААГ).

С использованием разработанной системы, продемонстрировано, что терморубин не влияет на инициацию трансляции, как ранее предполагалось [7], а воздействует на элонгацию и/или терминацию. Также показано, что антибиотик дестабилизирует аминоацил-тРНК в А-сайте рибосомы, что приводит к преждевременному абортированию синтеза белка или быстрой

транслокации пептидил-тРНК в Р-сайт; кроме того, расположение терморубина в районе B2-аминотрикетидного мостика стерически мешает связыванию RFs I класса, что приводит к ингибированию терминации трансляции.

В работе выявлен механизм действия цистоцина – антибиотика, открытого в начале 2000-х годов [8]. Впервые показано, что цистоцин не только структурно похож на известный антибиотик – пуромицин, но и обладает подобным механизмом действия: переносит на себя растущую полипептидную цепь, что приводит к преждевременному обрыву трансляции. Детали данного процесса еще предстоит выяснить, но предполагается, что как и пуромицин, цистоцин способен имитировать 3'-конец аминоацилированной тРНК и связываться с А-сайтом рибосомы.

Цель и задачи

Целью данной работы является определение механизмов действия антибиотиков терморубина и цистоцина с помощью различных *in vitro* методов.

Для ее достижения поставлены следующие задачи:

1. Разработка BODIPY-системы трансляции для изучения механизма действия терморубина, цистоцина и ингибиторов биосинтеза белка, связывающихся с 50S субъединицей рибосом.
2. Определение влияния цистоцина на биосинтез белка и сравнение механизма его действия с пуромицином.
3. Определение влияния терморубина на стадии инициации, элонгации и терминации трансляции.

Объект исследования

Объектами данного исследования являются природные антибиотики: цистоцин, выделенный из *Streptomyces sp. Ac-502* и терморубин, полученный из *Thermoactinomyces antibioticus*, а также трансляционный аппарат бактерий.

Предмет исследования

Предметом исследования данной работы являются механизмы действия терморубина и цистоцина, анализ структуры их взаимодействия с рибосомой, а также разработка BODIPY-

системы трансляции для изучения механизма действия антибиотиков, воздействующих на биосинтез белка.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые был разработан новый метод (BODIPY-система трансляции), позволяющий изучить влияние антибиотиков на каждую стадию биосинтеза белка (инициацию, пептидилтрансферазную реакцию, транслокацию и терминацию трансляции) по отдельности. Разработанный метод обладает рядом достоинств: он прост в использовании, не требует дорогостоящего оборудования, может быть реализован в любой научной лаборатории, дает возможность быстрого получения результатов.

Используя BODIPY-систему трансляции, различные *in vitro* и *in vivo* подходы с использованием двойной репортерной системы DualRep2 из нового продуцента *Streptomyces sp.* Ac-502 (Всероссийская коллекция микроорганизмов) был выделен описанный ранее малоизученный антибиотик – цистоцин. Впервые было показано, что по механизму действия цистоцин подобен ближайшему структурному родственнику – пуромицину.

Кроме того, в данной работе детально описан механизм действия антибиотика терморубина, открытого в 1964 году. Ранее считалось [7], что терморубин является ингибитором инициации трансляции, однако в данной работе это утверждение полностью опровергается. В сотрудничестве с научными группами М. Г. Гагнона и Ю. С. Поликанова с использованием криоэлектронной микроскопии были получены структуры рибосомы с антибиотиком с размещенными тРНК в А- и Р-сайтах. Также в сотрудничестве с коллегами из лаборатории А. Л. Коневеги в ходе *in vitro* экспериментов были получены кинетические данные, свидетельствующие о том, что терморубин влияет на элонгацию и/или терминацию трансляции.

Научная и практическая значимость исследования

Разработанный метод – BODIPY-система трансляции – открывает большие возможности по изучению механизма действия антибиотиков, благодаря своей дешевизне и простоте в использовании. Система позволяет детектировать короткие пептиды с разрешением до 1 аминокислотного остатка в денатурирующем РНК полиакриламидном геле, а также изучать влияние антибактериальных веществ на биосинтез белка.

С помощью данного метода был охарактеризован механизм действия двух исследованных антибиотиков – цистоцина и терморубина – ингибиторов трансляции. Полученные биохимические и структурные данные открывают возможность для дальнейшей модификации терморубина, которая позволит его использовать в клинических исследованиях.

Также в работе впервые был найден и охарактеризован новый продуцент цистоцина – *Streptomyces sp. Ac-502*.

Методология диссертационного исследования

Для достижения цели и поставленных задач применялись современные методы и подходы в области молекулярной биологии.

Для определения механизма действия терморубина и цистоцина были задействованы следующие *in vivo* и *in vitro* методы: использование двойной репортерной системы DualRep2, постановка *in vitro* трансляций (E. coli S30 Extract System for Linear Templates» (Promega, США); PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США), определение МИК, отбор устойчивых клонов, различные вариации toe-print анализов, определение цитотоксичности, профилирование рибосом в градиенте сахарозы, постановка toe-seq анализа [9].

Кроме того, в работе впервые описывается разработанный новый метод для определения механизма действия антибиотиков, ингибирующих биосинтез белка – «BODIPY-система трансляции».

В сотрудничестве с научной группой В. А. Алферовой были произведены ВЭЖХ, LC-MS, МИКи и ЯМР анализы для цистоцина; в сотрудничестве с научными группами М. Г. Гагнона и Ю. С. Поликанова были получены структурные данные, а в сотрудничестве с коллегами из лаборатории А. Л. Коневеги – кинетические данные по терморубину.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная BODIPY-система для мониторинга *in vitro* трансляции позволяет исследовать и визуализировать этапы биосинтеза белка, а также анализировать механизм действия антибиотиков (их влияние на инициацию, элонгацию и терминацию трансляции).
2. Цистоцин, подобно пуромицину, способствует абортированию трансляции за счет переноса на себя растущей полипептидной цепочки.
3. Терморубин ингибитирует стадии элонгации и/или терминации трансляции, не оказывая прямого ингибирующего воздействия на инициацию трансляции.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования определяется воспроизводимостью экспериментальных данных. Экспериментальные процедуры соответствуют поставленным

задачам и целям. Достоверность результатов подтверждена публикациями в рецензируемых международных журналах, индексируемых базами данных Scopus и Web of Science.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на двух конференциях:

1. VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024 и XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ, 2024.
2. Школа-конференция для молодых ученых «Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним», 2023.
3. X Всероссийский молодежный научный форум с международным участием “Open Science 2023”, 2023.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

В работе (1 и 2) автор принимал участие в разработке, планировании и выполнении экспериментов, анализе данных, подготовке текста к публикации. В работе (3) автор принимал участие в планировании и выполнении экспериментов (постановка *in vitro* трансляций, определение МИК, проведение toe-print анализа и экспериментов на клетках), подготовке текста к публикации. В работе (4) автор принимал участие в разработке, планировании и выполнение *in vivo* и *in vitro* экспериментальной части (эксперименты в BODIPY-системе трансляции, постановка toe-print анализов; экспериментальная работа с клетками), анализе полученных результатов и подготовке текста к публикации. (5-7) работы представляют собой тезисы докладов на конференциях.

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Marina Valeriya I., Bidzhieva Medina, Tereshchenkov Andrey G., Orekhov Dmitry, Sagitova Vladislava E., Sumbatyan Nataliya V., Tashlitsky Vadim N., Ferberg Artem S., Maviza Tinash P., Kasatsky Pavel, Tolicheva Olga, Paleskava Alena, Polshakov Vladimir I., Osterman Ilya

A., Dontsova Olga A., Konevega Andrey L., Sergiev Petr V. An easy tool to monitor the elemental steps of in vitro translation via gel electrophoresis of fluorescently labeled small peptides // RNA biology. 2024. Vol. 30, № 3. P. 298–307. **JIF 3.4 (WoS); 1.3 печатных листов; личный вклад – 80% [10];**

2. Tolicheva O.A., Bidzhiava M.S., Kasatskiy P.S., **Marina V.I.**, Sergiev P.V., Konevega A.L., Paleskava A. Separation of Short Fluorescently Labeled Peptides by Gel Electrophoresis for an In Vitro Translation Study // Nanobiotechnology Reports. 2024. Vol. 19, № 3. P. 423–431. **JIF 0.5 (WoS); 0.9 печатных листов; личный вклад – 10% [11];**

3. Alferova Vera A., Zotova Polina A., Baranova Anna A., Guglya Elena B., Belozerova Olga A., Pipiya Sofiya O., Kudzhaev Arsen M., Logunov Stepan E., Prokopenko Yuri A., Marenkova Elisaveta A., **Marina Valeriya I.**, Novikova Evgenia A., Komarova Ekaterina S., Starodumova Irina P., Bueva Olga V., Evtushenko Lyudmila I., Ariskina Elena V., Kovalchuk Sergey I., Mineev Konstantin S., Babenko Vladislav V., Sergiev Petr V., Lukianov Dmitrii A., Terekhov Stanislav S. Mining Translation Inhibitors by a Unique Peptidyl-Aminonucleoside Synthetase Reveals Cystocin Biosynthesis and Self-Resistance // International Journal of Molecular Science. 2024. Vol. 25, № 23. **JIF 4.9 (WoS); 1.8 печатных листов; личный вклад – 25% [12];**

4. Paranjpe Madhura N. *, **Marina Valeria I.** *, Grachev Aleksandr A. *, Maviza Tinashe P., Tolicheva Olga A., Paleskava Alena, Osterman Ilya A., Sergiev Petr V., Konevega Andrey L., Polikanov Yury S., Gagnon Matthieu G. Insights into the molecular mechanism of translation inhibition by the ribosome-targeting antibiotic thermorubin // Nucleic Acids Research. 2023. Vol. 51, № 1. P. 449–462. **JIF 13.1 (WoS); 1.9 печатных листов; личный вклад – 30% [13].**

Тезисы докладов на конференциях

5. **Марина В.И.**, Сагитова В.Э., Ферберг А.С., Биджиева М.С., Толичева О.А., Полесская Е.В., Коневега А.Л., Остерман И.А., Донцова О.А., Сергиев П.В. BODIPY-флуоресцентно меченные небольшие пептиды как инструмент для мониторинга этапов трансляции *in vitro* // VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024 и XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ. 2024 [14]

6. Биджиева М.С., Толичева О.А., **Марина В.И.**, Сагитова В.Э., Донцова О.А., Сергиев П.В., Полесская Е.В., Коневега А.Л. Система детектирования полипептидов в полиакриламидном геле с использованием флуорофора BODIPY // Школа-конференция для молодых ученых «Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним». 2023 [15]

* Равнозначный вклад авторов

7. Биджиева М.С., Толичева О.А., **Марина В.И.**, Сагитова В.Э., Донцова О.А., Сергиев П.В., Полесская Е.В., Коневега А.Л Усовершенствованная система детектирования полипептидов // Сборник тезисов докладов X Всероссийского молодежного научного форума с международным участием “Open Science 2023”. 2023 [16]

Личный вклад автора

Все приведенные в работе данные были получены автором лично или при его непосредственном участии. В междисциплинарных работах принимала участие большая группа авторов, вклад каждого был отражен в публикациях (в самой работе такие данные помечены следующим образом: «в сотрудничестве с научной группой»). Автор принимал участие в планировании и постановке экспериментов, в выборе направления пути и развития исследований, обработке и анализе экспериментальных данных и представлении полученных результатов. Некоторые экспериментальные исследования были проведены PhD выпускником Центра наук о живом Сколковского института науки и технологии Тинаше П.М., а также аспирантом Зотовой Полиной при непосредственном участии автора.

Структура и объём диссертации

Объем диссертации составляет 135 страниц и включает в себя следующие разделы: «Список сокращений», «Список публикаций», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Список литературы» и «Приложение». Работа содержит 13 таблиц и 79 рисунков, а также 163 источника литературы.

Обзор литературы

1. Методы изучения ингибиторов биосинтеза белка

1.0 Трансляция в прокариотических клетках

Процесс биосинтеза белка можно глобально разделить на 4 основные стадии, каждая из которых требует вспомогательных факторов:

1. Инициация трансляции

В бактериальных клетках процессы трансляции и транскрипции сопряжены во времени и пространстве, т.о. можно сказать, что инициация трансляции происходит котранскрипционно.

Этапы:

А) На мРНК располагается последовательность Шайна-Дальгарно (SD) (на расстоянии 8-10 нуклеотидов от старт-кодона), которая узнается комплементарной последовательностью 16S рРНК малой субъединицы рибосомы (анти-SD);

В случае канонической инициации трансляции:

Б) Далее происходит сборка 30S инициаторного комплекса – 30S IC;

В) После присоединяется 50S субъединица рибосомы;

Г) Затем происходит аккомодация fMet-tRN^{fMet} в P-сайте рибосомы.

Однако существует и альтернативный вариант – сканирование 70S рибосомы [17].

Последовательность событий приводит к формированию 70S инициаторного комплекса (70S IC), готового к элонгации трансляции [18]. На всех этапах необходимо присутствие IFs – IF1, IF2 и IF3 – факторов инициации (рис. 1).

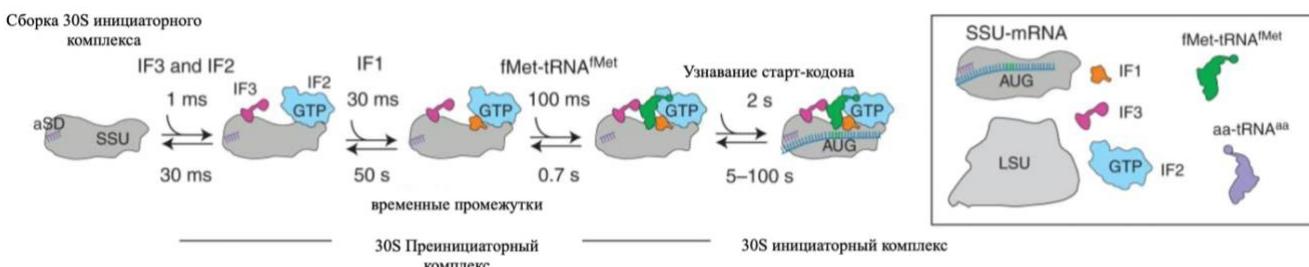


Рис. 1 Сборка 30S инициаторного комплекса. IFs – факторы инициации трансляции; fMet-tRN^{fMet} – (инициаторная тРНК) fMet-tRN^{fMet}; SSU – малая субъединица рибосомы; LSU – большая субъединица рибосомы; aSD – анти Шайна-Дальгарно последовательность [19].

IF3 предотвращает преждевременное связывание большой и малой субъединиц, а также участвует в верификации инициаторной тРНК [20]. GTPase IF2 играет ключевую роль в привлечении fMet-tRN^{fMet} (с образованием тройного комплекса) к 30S преинициаторному комплексу и в регуляции формирования 70S инициаторного комплекса [21].

После сборки 30S инициаторного комплекса происходит: а) присоединение 50S субъединицы рибосомы б) гидролиз GTP-IF2, и fMet-tRN^{fMet} размещается в P-сайте рибосомы [20-22] в) диссоциация IF1 и IF2, смещение IF3.

Последовательность данных событий приводит к образованию зрелого инициаторного комплекса 70S (рис. 2).

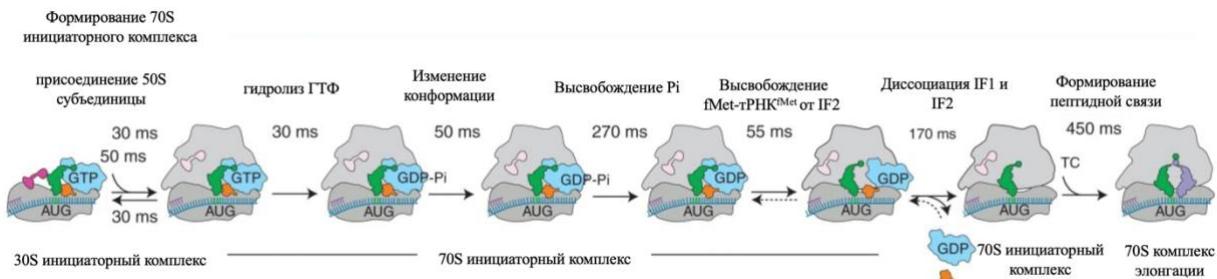


Рис. 2 Последовательность этапов сборки 70S инициаторного комплекса: присоединение 50S субъединицы, гидролиз GTP из (GTP-IF2), высвобождение Pi, диссоциация IF1 и IF2 от рибосомы. ТС – тройной комплекс (аминоацил-tRN^K, EF-Tu и GTP); Pi – остаток ортофосфорной кислоты.

2. Элонгация трансляции

Элонгация трансляции представляет собой последовательно сменяющие друг друга этапы а) декодирования, б) формирования пептидных связей и в) транслокации.

А) При декодировании происходит распознавание аа-tRN^K в А-сайте, которая доставляется в рибосому в составе тройного комплекса с EF-Tu и GTP. При правильном позиционировании аа-tRN^K не нарушается Уотсон-Криковская геометрия кодон-антикодоновых взаимодействий и происходит гидролиз GTP [24], [25]. После гидролиза GTP, последовательно высвобождается Pi и EF-Tu, связанный с GDP [26]. Важно отметить, что при таком конформационном изменении происходит позиционирование 3'-концевого фрагмента аа-tRN^K в пептидилтрансферазном центре.

Б) Затем рибосома вступает в пептидилтрансферазную реакцию – реакцию образования пептидных связей, при которой расположенный в Р-сайте растущий полипептид, переносится на аа-tRN^K в А-сайте. Процесс образования пептидной связи происходит путем нуклеофильной атаки аминогруппы остатка аминокислоты аа-tRN^K на карбонильный атом углерода сложноэфирной связи в пептидил-tRN^K [27]. После атаки в Р-сайте остается деацилированная tRN^K, а в А-сайте располагается пептидил-tRN^K.

В) После пептидилтрансферазной реакции начинается процесс транслокации, который обеспечивается EF-G за счёт гидролиза GTP [28]: гидролиз способствует конформационным перестройкам малой субъединицы рибосомы, вследствие чего нарушается взаимодействие с tRN^K, которая перемещается из А-сайта в Р-сайт [29] (рис. 3).

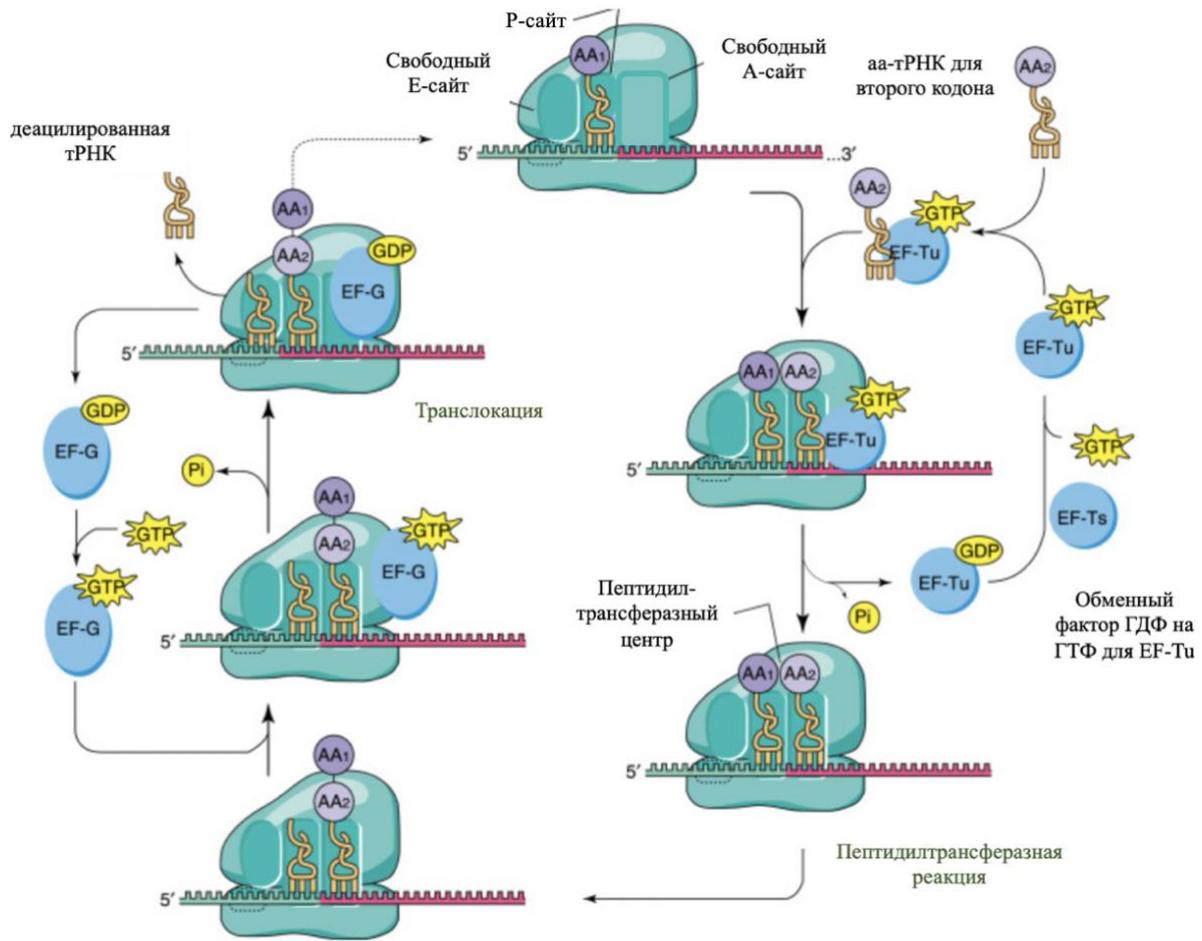


Рис. 3 Элонгационный цикл рибосомы: декодирование с помощью EF-Tu, спонтанная пептидилтрансферазная реакция, транслокация с помощью EF-G. Показан EF-Ts фактор, который обменивает GDP на GTP в комплексе с EF-Tu [30].

Растущий полипептид при элонгации продвигается по рибосомному туннелю (NPET – nascent polypeptide exit tunnel), который часто является мишенью действия различных антибиотиков – макролидов [31] или руимицидинов [32].

3. Когда в А-сайте рибосомы располагается один из трех стоп-кодонов, рибосома вступает в третий этап синтеза белка – терминацию трансляции. У прокариот стоп-кодон UAA узнается RF1 и RF2 (факторами терминации I класса), в то время как UAG – только одним фактором – RF1, а UGA – RF2, которые принимают участие также в высвобождении полипептида за счет гидролиза сложноэфирной связи пептидил-tРНК [33]. Затем RF1 или RF2 диссоциируют из рибосомы под действием гидролиза GTP, вызванного действием RF3 (фактора терминации II класса) [34] (рис. 4 А).

4. За терминацией трансляции следует рибосомный рециклинг, который обеспечивает разборку 70S рибосомы, высвобождение tРНК и мРНК для осуществления нового раунда трансляции [35]. Диссоциацию рибосомных субъединиц обеспечивают два фактора – RRF

(ribosome recycling factor или фактор рециклирования рибосом), а также GTPase EF-G [36]. Ранее считалось, что эти факторы способствуют и диссоциации деацетилированной тРНК из Р-сайта, и мРНК, однако последние исследования показывают, что за это отвечает фактор инициации – IF3 [37] (рис. 4 Б, В).

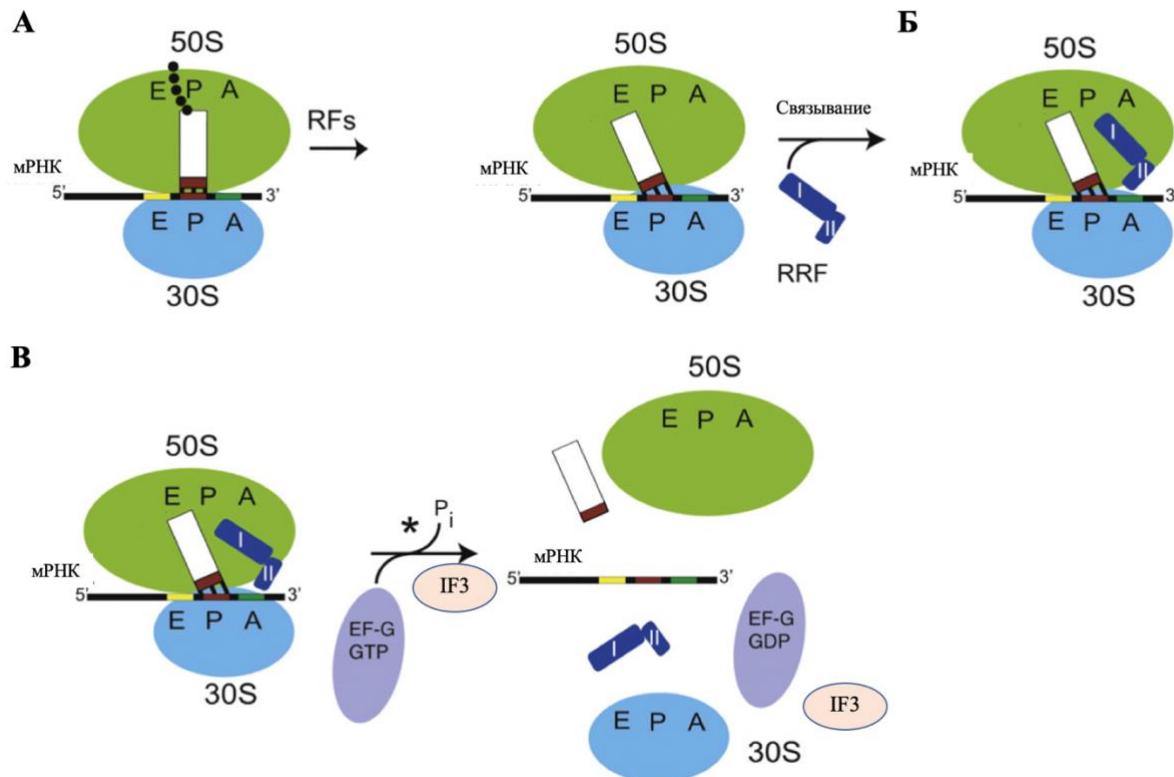


Рис. 4 Схема терминации трансляции и рециклирования у прокариот. (А) Терминация трансляции - в А-сайте оказывается стоп-кодон, распознавающийся RFs. При распознавании происходит высвобождение растущего полипептида. (Б) RRF (фактор рециклирования рибосомы [35], [38], [39]). (В) EF-G вместе с RRF способствуют диссоциации рибосомных субъединиц друг от друга [36]. Затем для удаления деацетилированной тРНК и мРНК из 30S субъединицы требуется фактор инициации IF3. Звездочка указывает на то, что процесс диссоциации субъединиц включает несколько стадий. Адаптировано из [40].

1.1 Детекция ингибиторов биосинтеза белка с помощью репортерных систем и *in vitro* трансляции

На сегодняшний день существует несколько разработанных репортерных систем, с помощью которых возможно оценить влияние антибиотика на биосинтез белка (таблица 1).

Что детектируют	Конструкция	Антибиотики	Ссылка	Примечание
Ингибиторы биосинтеза белка	pL- <i>luxAB</i> (<i>Vibrio harveyi</i>)	Тетрациклин, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, эритромицин, спирамицин, сульфадиазин	[41]	На основе репортерной системы – LuxCDABE
Макролиды	<i>E. coli</i> Ptac- <i>ermC(L)</i> – <i>lacZ(a)</i> .	Эритромицин, кларитромицин, азитромицин, джозамицин, спирамицин	[42]	На основе репортерного гена LacZ (бета-галактозидазы)
Ингибиторы биосинтеза белка	<i>E. coli</i> : <i>ΔtolC</i> pDualRep2	Эритромицин, хлорамфеникол, тетрациклин, клиндамицин, азитромицин и др.	[43]	Двойная репортерная система: позволяет детектировать антибиотики, вызывающие SOS-ответ клетки, а также нарушающие биосинтез белка (модифицированный лидерный пептид триптофанового оперона)
Ингибиторы биосинтеза белка	<i>E. coli</i> <i>ptetA</i> – <i>luxCDABE</i> (<i>P. luminescens</i>)	рифампицин, хлорамфеникол, эритромицин	[44]	Индуцибельный тетрациклический промотор <i>tetA</i> , репортерная система- LuxCDABE
Макролиды	<i>E. coli</i> <i>pmphR</i> – <i>luxCDABE</i> (<i>Vibrio fischeri</i>)	Эритромицин, азитромицин, тетрациклин, хлорамфеникол, Гентамицин и др.	[45]	Макролидный индуцибельный промотор <i>mpmA</i> ; репортерная система- LuxCDABE

Таблица 1. Некоторые репортерные системы, с помощью которых можно детектировать антибиотики, ингибирующие биосинтез белка.

Как правило, для большинства репортерных систем используют три основные группы репортерных генов: 1) ген бета-галактозидазы; 2) гены люцифераз; 3) гены флуоресцентных белков.

1) Для системы на основе репортерного гена бета-галактозидазы (открытой в 1970-х годах) характерно использование экзогенных хромогенных субстратов X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индоил- β -D-галактопиранозид) или ONPG (O-нитрофенил- β -D-галактопиранозид) [46]. Систему активно применяют для поиска всевозможных антибиотиков, влияющих на синтез клеточной стенки, индуцирующих SOS-ответ клетки или нарушающих биосинтез белка [47], клонируя ген *lacZ* под промоторы, чувствительные к разным механизмам действия антибиотиков.

Принцип действия системы основан на синтезе фермента бета-галактозидазы, который превращает бесцветные субстраты в окрашенные продукты (рис. 5)

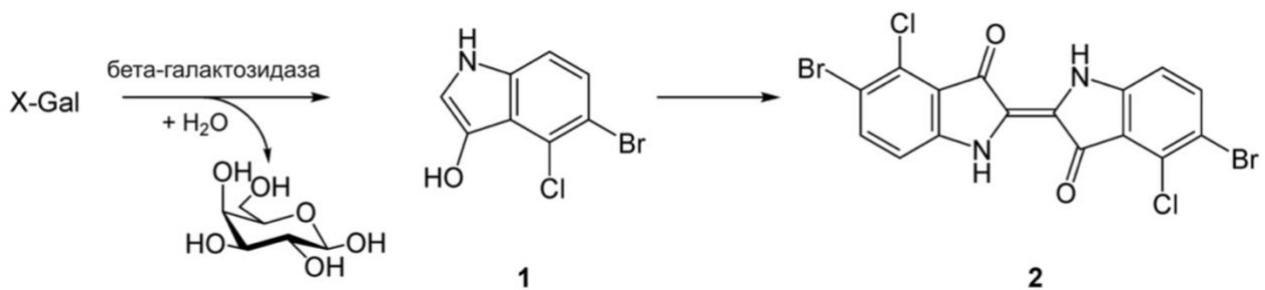


Рис.5 Реакция расщепления хромогенного субстрата (X-Gal) бета-галактозидазой с образованием промежуточного соединения - 5-бromo-4-хлоро-3-гидроксииндол, которое затем окисляется до 5,5'-дигидро-4,4'-дихлороиндиго (синяя окраска) .

К достоинствам данной системы можно отнести ее простоту, быстроту получения результата и наглядность, однако из-за низкой чувствительности, ее использование ограничено [48], [49].

2) Вторая система использует биолюминесцентные репортеры, на основе генов люцифераз светлячков (*fluc*), кораллов (*rluc*), изображенных на рисунке 6, или бактерий (*luxCDABE* оперон) – рисунок 7.

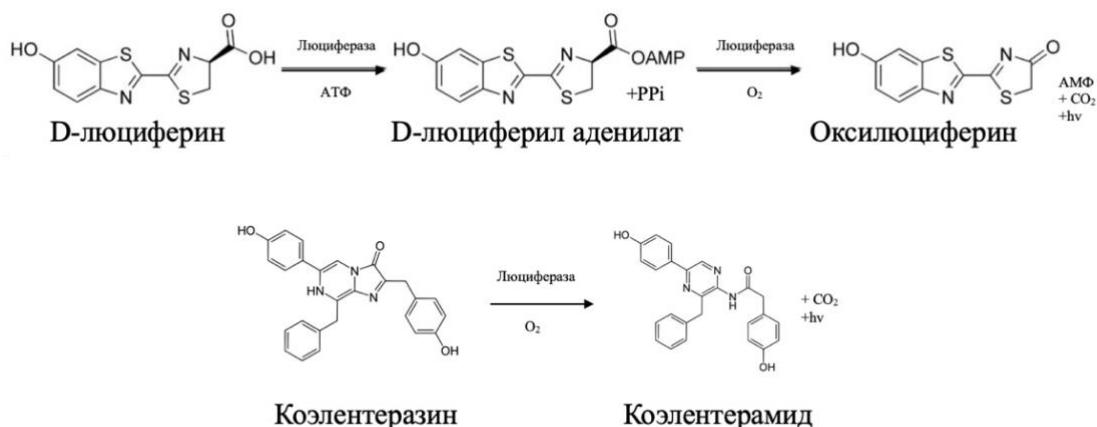


Рис. 6 Химические реакции окисления экзогенных субстратов под действием люцифераз (светлячка (Fluc) – верхняя цепь [50]; коралла (Rluc) – нижняя цепь) с выделением квантов света [51].

По сравнению с первой системой (на основе гена *lacZ*), Rluc/Fluc требуют добавления экзогенных дорогостоящих субстратов.

Другая люциферазная система – разновидность *lux*-системы – содержит бактериальный *luxCDABE* оперон, кодирующий все необходимые для синтеза субстрата и осуществления реакции ферменты (рис. 7), что делает его самодостаточным, в отличие от систем, использующих люциферазы светлячков или кораллов.

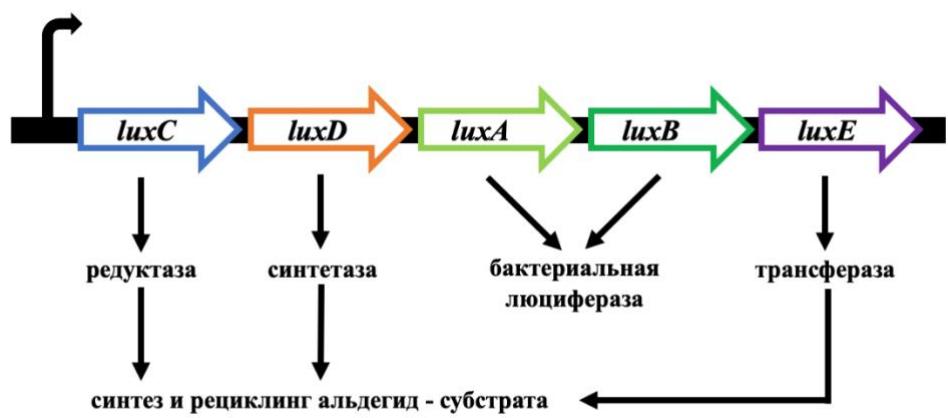


Рис. 7 Строение *luxCDABE* оперона с указанием генов и кодируемых им белков: гены *luxA* и *luxB* формируют бактериальную люциферазу, *luxC* (редуктаза), *luxD* (синтетаза) и *luxE* (трансфераза) необходимы для синтеза и рециклирования жирных альдегидов, которые являются субстратом для бактериальной люциферазы [52].

Изучение антибиотиков, подавляющих трансляцию, и принципов синтеза белка *in vivo* вызывает трудности из-за сложности трансляционного аппарата, а также изменчивости живых клеток. Альтернативные системы *in vitro* удобнее в использовании, поскольку в них легко оптимизировать экспрессию рекомбинантных белков [53]. Как раз в таких системах нашли свое применение гены люцифераз светлячка (*fluc*) и коралла (*rluc*).

В *in vitro* трансляции чаще всего используются моноцистронные мРНК, несущие информацию об одном репортерном гене, однако нередко встречаются и бицистронные системы, позволяющие изучать различные аспекты биосинтеза белка (например, отличие IRES-зависимой от IRES-независимой инициации трансляции) [54]. Также существует тройная репортерная конструкция, содержащая гены *rluc*, *fluc* и *lacZ*, разделенные 2A вирусной пептидной последовательностью [55].

Принципиальная схема *in vitro* трансляции показана на рис. 8. В отсутствии ингибиторов биосинтеза белка в системе осуществляется синтез фермента люциферазы, который окисляет добавленный экзогенный субстрат – D-люциферин – до оксилюциферина. При этом происходит испускание квантов света, детектируемых сканером флуоресценции. Значения сигнала в определенном «линейном» диапазоне прямо пропорциональны эффективности трансляции.

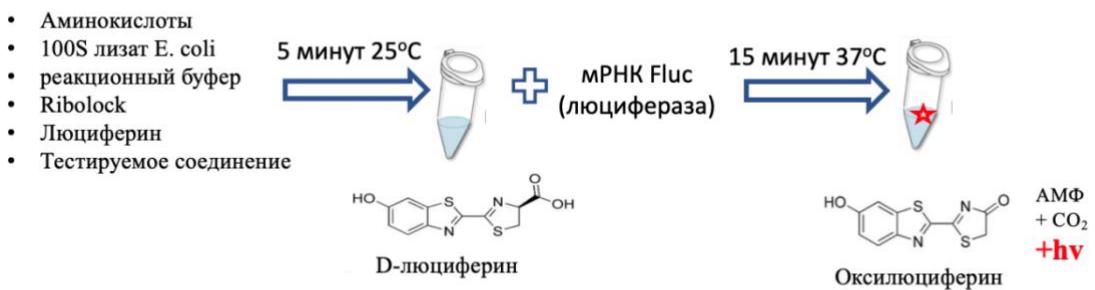


Рис. 8 Схема *in vitro* трансляции с использованием моноцистронной мРНК, кодирующей белок люциферазы светлячка (*fluc*), и коммерческого набора NEBExpress® Cell-free *E. coli* Protein Synthesis System на основе лизата *E. coli*.

3) В последней, наиболее наглядной системе, используются гены флуоресцентных белков, имеющих всевозможные спектры поглощения и излучения. Первым открытим геном является *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка (пик поглощения при 395 нм (основной) и 475 нм (минорный) и пик излучения при 509 нм), выделенный из медузы *Aequorea victoria* [56]. На сегодняшний день используют огромное количество различных флуоресцентных белков, таких как: RFP, Cerulean, Katushka, mCherry и др. [57], [58].

Благодаря стабильности сигналов, отсутствию необходимости добавления экзогенных субстратов и кофакторов, а также простоте визуализации, репортерные системы на основе флуоресцентных белков применяют в высокопроизводительном скрининге антибиотиков [59], [60].

Система, разработанная в лаборатории О. А. Донцовой, И. А. Остреманом и П.В. Сергиевым DualRep2 [61] использует а) размещенный под конститутивным промотором T5, ген дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S, расположенного после последовательности, кодирующей модифицированный лидерный пептид триптофанового оперона (TrpL2Ala); б) ген красного флуоресцентного белка turboRFP (RFP), интегрированного под промотор генов SOS-ответа (рис. 9).

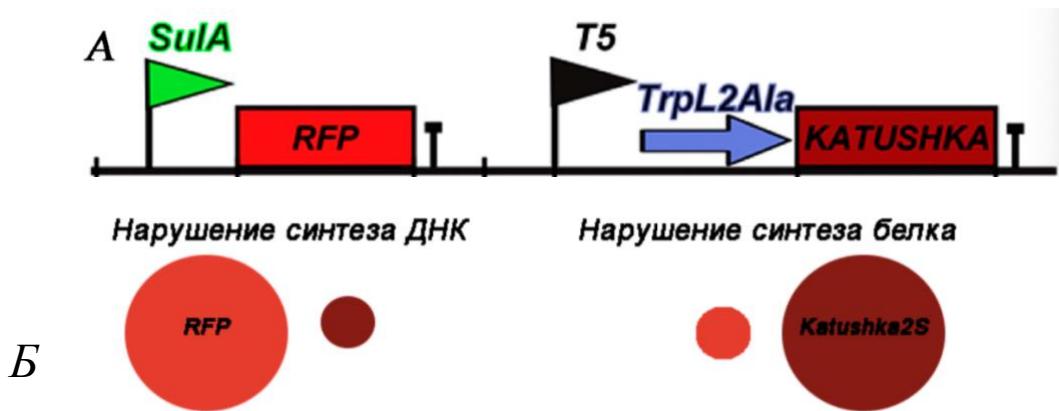


Рис. 9 Принципиальная схема двойной репортерной системы DualRep2. (А) строение репортерной конструкции: красным прямоугольником обозначен ген *rfp* – красного флуоресцентного белка, помещенный под промотор генов SOS-ответа (SulA), черный треугольник – конститутивный промотор T5, под который интегрирован коричневый прямоугольник – ген дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S, расположенного после последовательности модифицированного лидерного пептида триптофанового оперона (TrpL2Ala). (Б) При ингибиовании трансляции происходит накопление белка Katushka2S, при индукции SOS-ответа, вызванного нарушением целостности ДНК – накопление turboRFP [62].

Необходимо отметить, что спектры двух красных флуоресцентных белков между собой не перекрываются (приложение 1, рис. 63).

Как известно, у бактерий транскрипция и трансляция сопряжены во времени и пространстве, поэтому рибосомы начинают движение сразу после того, как высвобождается 5'-конец мРНК из РНК-полимеразы. Принцип детекции антибиотиков, ингибирующих биосинтез белка, в двойной репортерной системе основан на принципе аттенюации [63].

В лидерном пептиде TrpL, расположенном перед генами триптофанового оперона, закодированы два подряд триптофановых кодона. РНК-полимераза начинает транскрипцию оперона, а рибосомы – трансляцию лидерного пептида TrpL. Если в среде недостаточно триптофана, рибосомы останавливаются на триптофановых кодонах (так как нет аа-тРНК^{Trp}), что приводит к формированию анти-терминационной шпильки (2-3, рис. 10, А). Напротив, при достаточном количестве триптофана в среде, рибосомы полностью транслируют лидерный пептид, стабилизируя терминационную шпильку 3-4 (рис. 10, Б). Последняя блокирует экспрессию нижерасположенных генов, и образование ферментов, ответственных за синтез триптофана не происходит.

Система была адаптирована для поиска антибиотиков, вызывающих нарушение биосинтеза белка, путем остановки транслирующих рибосом: гены триптофанового оперона были заменены на ген *katushka2S*, помещенного сразу после модифицированного лидерного пептида триптофанового оперона (TrpL), в котором два триптофановых кодона были заменены на аланин (распространенную в бактериальных клетках аминокислоту). Под воздействием

антибиотиков, воздействующих на биосинтез белка, происходит остановка транслирующих рибосом, что способствует формированию анти-терминационной шпильки и экспрессии белка Katushka2S (рис. 9).



Рис. 10 Принцип аттенюации на примере генов триптофанового оперона *E.coli* [62]. А. При недостатке триптофана в среде происходит формирование анти-терминационной шпильки 2-3 Б. Формирование терминационной шпильки 3-4 при избытке триптофана в среде.

1.2 Изучение трансляционных событий и механизмов действия антибиотиков, ингибирующих биосинтез белка, с помощью toe-print анализа

Одним из самых первых методов, позволяющих определить механизм действия ингибиторов трансляции, по праву считается toe-print анализ [64].

В сопряженной транскрипционно-трансляционной системе в присутствии fMet-tРНК^{fMet} проводят биосинтез белка в различных контролируемых условиях (например, с или без добавления антибиотических веществ [65], [66]). Далее в систему добавляют олигонуклеотидную последовательность, меченную изотопом 5'-³²P, комплементарную 3'-НТО, и компоненты для обратной транскрипции, способствующие удлинению 5'-³²P меченного праймера до столкновения обратной транскриптазы с заблокированной на мРНК рибосомой (рис. 11). Полученные одноцепочечные кДНК, содержащие метку ³²P на 5'-конце, анализируются с помощью 6% полиакриламидного геля при помощи электрофореза [67].

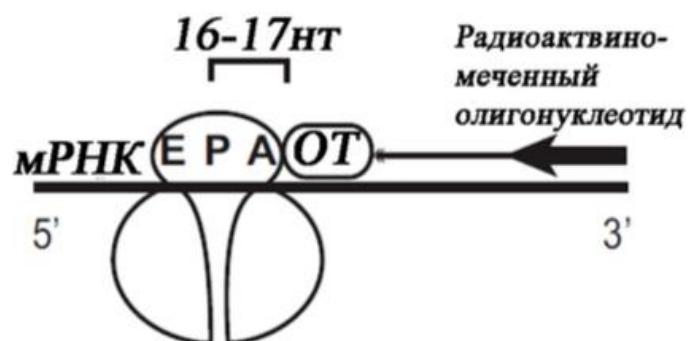


Рис. 11 Принципиальная схема изотопного toe-print анализа. Обратная транскриптаза (ОТ) прекращает синтез кДНК по мРНК при столкновении с рибосомой. Расстояние между последним синтезированным ОТ нуклеотидом и первым нуклеотидом кодона, расположенного в Р-сайте рибосомы, составляет 16–17 нуклеотидов [64].

Toe-print анализ помогает определить кодон, на котором произошла остановка рибосомы под действием различных факторов (в том числе антибиотиков), что делает этот метод удобным в использовании. Однако существует и ряд ограничений: так, невозможно отличить, на какую именно стадию трансляции произошло воздействие [68]: например, отличить между собой ингибирование пептидилтрансферазной реакции от транслокации не представляется возможным, поскольку нельзя достоверно сказать, в каком именно состоянии будет пептидил-тРНК (Р/Р или А/Р или А/А).

Если антибиотик воздействует на инициацию трансляции, (например, блокирует сборку 30S инициаторного комплекса), то на геле будут отсутствовать любые продукты обратной транскрипции, кроме полноразмерной кДНК. Более того, отличить это событие от отсутствия влияния на трансляцию в целом (также будет пустая дорожка на геле), будет затруднительно. Безусловно, модифицируя toe-print анализ, собирая систему из отдельных очищенных компонентов, можно с точностью определить влияние на инициацию трансляции, однако такой подход требует наличия дорогостоящих реагентов. Другим ограничением метода является его сложность и небезопасность эксплуатации, поскольку работа с изотопной меткой требует дополнительных мер предосторожности. Кроме того, дороговизна, не очень высокая чувствительность метода, а также нестабильность радиоактивных меток (например, у ^{32}P периодом полураспада составляет 14 дней) усложняют его применение [69].

Недавно был разработан альтернативный вариант toe-print анализа – флуоресцентный toe-print – который, вместо изотопной метки, использует флуоресцентно меченный олигонуклеотид [70]. Метод считается более безопасным, поскольку анализируются флуоресцентно меченные кДНК продукты с помощью капиллярного гель-электрофореза. Другим достоинством флуоресцентного toe-print анализа является точность определения (до 1 нуклеотида) места остановки рибосом на мРНК [71]. Кроме того, за счет автоматического секвенатора, возможно выполнение множественных параллельных анализов кДНК фрагментов, с использованием различных флуоресцентных меток.

Интересным дополнением к toe-print анализу является RelE printing [72], позволяющий выявить вакантность А-сайта рибосомы и определить местоположение застрявшего трансляционного комплекса на мРНК. Механизм действия RelE токсина (универсальный токсин, который участвует в реакциях на стресс как у бактерий, так и у архей) основан на разрезании мРНК в свободном А-сайте заблокированных рибосом [73]. Необходимо подчеркнуть, что происходит разрезание только мРНК, находящейся в комплексе с рибосомой (свободная мРНК

не поддается действию токсина). Природными конкурентами RelE являются tРНК и RFs, что также указывает на общее место связывания их в транслирующем комплексе. Данный токсин работает как в эукариотической, так и прокариотической бесклеточных системах трансляции.

1.3 Изучение трансляции кинетическими методами

Используя анализ формирования радиоактивно меченых ди- или трипептидов, разделенных с помощью ВЭЖХ [74], можно изучить быструю кинетику: связывание тРНК в A-сайте, пептидилтрансферазную реакцию и транслокацию.

Поскольку процесс элонгации состоит из многих стадий, протекающих очень быстро (меньше 2 мс), то для изучения трансляционных событий необходим метод, который способен их регистрировать - метод спектрофлюориметрии остановленного потока (stopped flow система).

Система stopped flow состоит из: термостатированной камеры с двумя наполненными растворами реагентов шприцами, небольшое количество веществ, которые под воздействием пневмопривода подаются через смеситель в кювету наблюдения (где осуществляются биохимические реакции). На приборе происходит измерение поглощения, интенсивность светорассеяния или флуоресценции (при введении флуоресцентной метки). Принципиальная схема прибора изображена на рисунке 12.

Например, при осуществлении реакции транслокации (с использованием флуоресцентно меченной тРНК), происходит перемещение тРНК относительно рибосомы, что способствует изменению микроокружения флуоресцентной метки, что, в свою очередь, влияет на интенсивность сигнала флуоресценции, детектируемой прибором.

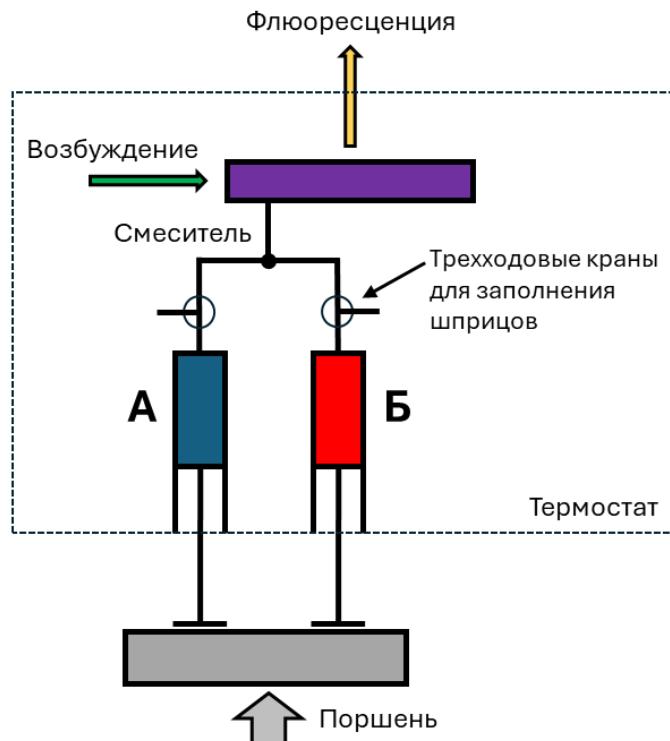


Рис. 12 Принципиальная схема системы stopped flow. Показан смеситель, пневмопривод (серый прямоугольник), два шприца с растворами реагентов (синий и красный), а также кювета наблюдения (фиолетовый прямоугольник). Регистрирование биохимических реакций проводят при длине волн возбуждения – 460/470 нм, сигнал флуоресценции детектируют при 495 нм и выше [75]. (рисунок предоставлен научной группой А. Л. Коневеги).

Вместо инициаторной fMet-tРНК^{fMet}, возможно использование флуоресцентно меченной BРY-Met-tРНК^{fMet} [19], [76].

Данный метод, применяемый в лаборатории А. Л. Коневеги, универсален: а) если происходит изучение транслокации, то в один шприц помещают претранслокационные комплексы с изотопной или флуоресцентной метками, а в другой EF-G, который будет осуществлять реакцию транслокации; б) если изучается связывание тРНК с А-сайтом рибосомы, то в один шприц помещают инициаторные комплексы, а во второй – тройной комплекс с флуоресцентной меткой; в) если анализируется ассоциация рибосомных субъединиц, то в шприцы помещают по отдельности 30S и 50S субъединицы, а прибор детектирует светорассеивание.

Для изучения пептидилтрансферазной реакции используется метод SPARK, разработанный в 2002 году [77]: два реакционных субстрата – один несет тритиевую метку, а второй – биотинилированную метку – связываются между собой в результате пептидилтрансферазной реакции. При этом тритий вызывает возбуждение сцинтиллятора, встроенного в покрытые стрептавидином микросферы SPA, что приводит к детектированию радиоактивности (рис. 13).

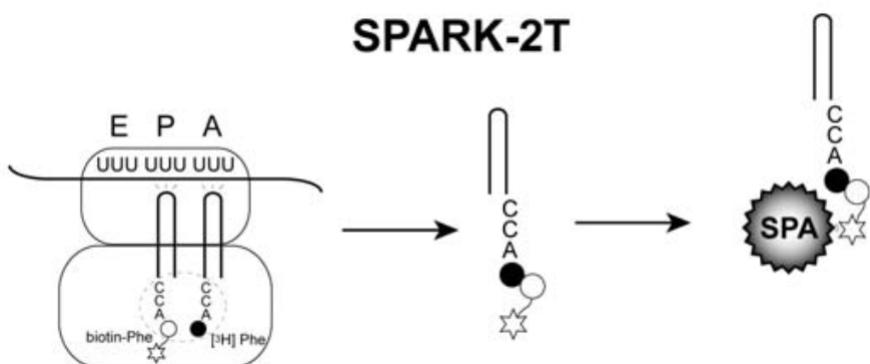


Рис. 13 Схема детекции пептидилтрансферазной реакции методом SPARK. Остаток фенилаланина, конъюгированный с N-биотином, переносится с биотин-Phe-tRNA^{Phe}, связанным в Р-сайте, на [³H]Phe-tRNA^{Phe}, расположенной в А-сайте. Продукт реакции улавливается покрытыми стрептавидином микросферами SPA, внутри которых встроен сцинтиллятор. За счет сближения трития с микросферой происходит активация сцинтиллятора.

Достоинством метода является возможность его автоматизации для высокопроизводительного скрининга новых антибиотиков, поскольку не требуется очистка продуктов реакции.

Иной системой, разработанной для изучения пептидилтрансферазной реакции, является метод погашенного потока - quenched flow. Устройство состоит из: термостабилизированной камеры, с помещенными растворами реагентов (например, для реакции образования дипептида смешивают 70S инициаторный комплекс (70S IC) с тройным комплексом [¹⁴C] EF-Tu•ГТФ•аа-tRNKAa ([¹⁴C]Val-tRNKVal или [¹⁴C]Phe-tRNKPhe) (избыток соответствующей аминоацил-tRNK над рибосомами), исследуемый антибиотик, буфером (в качестве примера ТАКМ7) и гасителем реакции (раствор щелочи или кислоты). Аналогично методу stopped flow, небольшое количество каждого реагента под действием привода подаются в реакционную петлю через смеситель. Затем реакционная смесь инкубируется, после чего подается во второй смеситель и останавливается добавлением гасителя реакции (рис. 14).

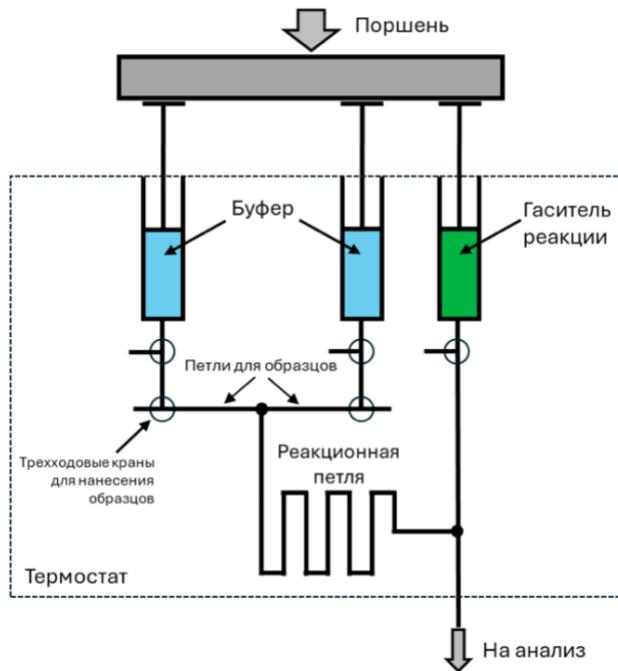


Рис. 14 Принципиальная схема системы quenched flow. Синими прямоугольниками показаны два отсека для реакционных буферов, зеленым – гаситель реакции (например, гидроксид калия), серым прямоугольником – привод; смеситель обозначен черными точками. (рисунок предоставлен научной группой А. Л. Коневеги).

Разница между quenched flow и stopped flow системами заключается в методе детектирования: stopped flow детектирует в режиме реального времени, а quenched flow – после определенного заданного временного интервала (например, 0,2 с), после которого образцы собираются и анализируются с помощью ВЭЖХ.

Обе системы для изучения реакций кинетики обладают следующими достоинствами: имеют высокую чувствительность и разрешение, позволяют изучать связывание тРНК в А-сайте, пептидилтрансферазную реакцию и транслокацию [78]. Тем не менее системы имеют ограничения по применению – необходимость использования дорогих реагентов и оборудования, сложность проводимых реакций, требующих манипуляций с изотопной/флуоресцентной метками [5].

1.4 Использование флуоресцентных меток для изучения биосинтеза белка

Для изучения структуры и динамики белков важными инструментами являются флуоресцентные метки, однако их включение крупных является технически сложной задачей.

Распространенным инструментом для изучения аппарата биосинтеза белка является введение флуорофоров в различные компоненты трансляции [79]. Однако в самых первых работах, посвященных изучению структуры и функции рибосом, исследования проводили с помощью естественных флуоресцентных нуклеозидов тРНК, таких как вибутозин (который расположен рядом с 3'-концом антикодона тРНК^{Phe} в 37 положении) (рис. 15) [80].

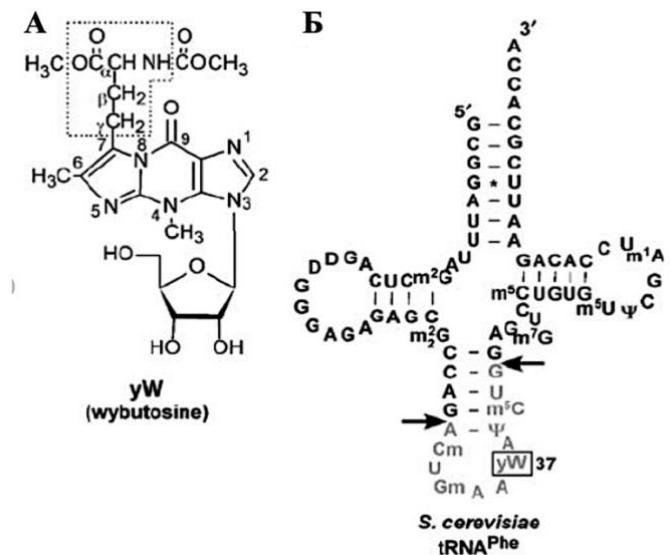


Рис. 15 Строение тРНК^{Phe}, и yW – вибутозина, расположенного в районе 3'-конца антикодона тРНК^{Phe} [81].

Детектируя изменения сигнала флуоресценции, было выявлено, что при связывании тРНК с рибосомой происходят конформационные изменения тРНК при кодон-антикодоновом взаимодействии [81].

Изучение природных флуоресцентных нуклеозидов не дает представления о деталях трансляционных процессов, поэтому в серии последующих работ использовались включенные в аминокислоты флуоресцентные метки.

Так, в работе 2012 года был произведен анализ взаимодействия тРНК-тРНК или тРНК-L1 рибосомного белка (использовались классический флуорофоры – Су3 и Су5) с помощью FRET. Авторы продемонстрировали возможность изучения скорости синтеза белков в режиме реального времени [82].

FRET (дословно переводится как «Фёрстровский перенос энергии») – перенос энергии от хромофора донора к хромофору акцептора без промежуточного испускания фотонов, при этом флуоресценция донора тушится, а у акцептора возникает более длинноволновая флуоресценция при диполь-дипольном взаимодействии [83] (рис. 16).

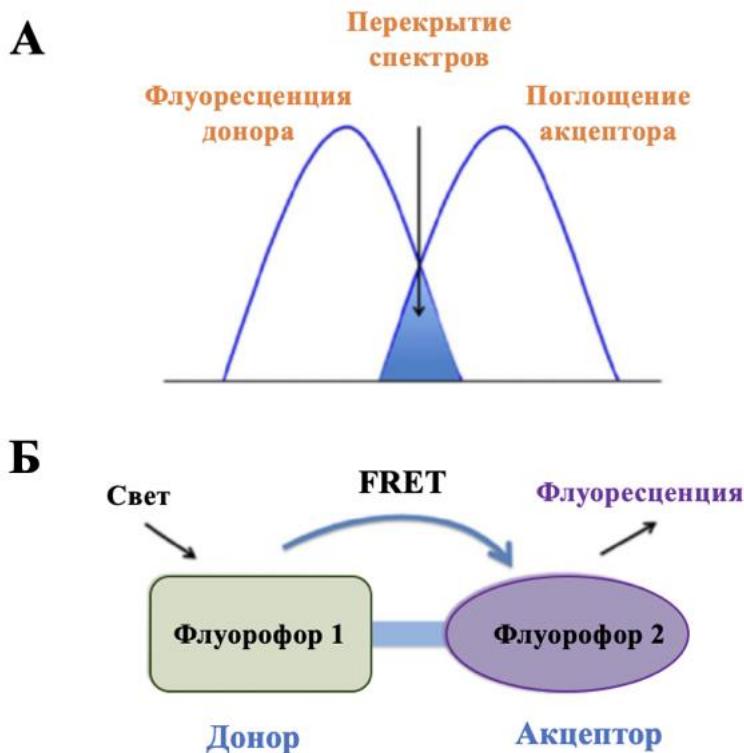


Рис. 16 Механизм FRET: передача энергии от возбужденного флуорофора 1 (донора) к более длинноволновому флуорофору 2 (акцептору), вызывая тушение флуоресценции первого и испускание света второго [84].

Введение флуоресцентных меток в аминокислоты позволило разработать кинетические модели для пошагового изучения трансляционных событий (от декодирования до котрансляционного сворачивания белков):

А) В 2008 году опубликовали модель инициации трансляции (с помощью введения флуорофора ATTO465 в цистеин (599 положение) IF2): было показано, что связывание IF2-GTP с 30S субъединицей рибосомы способствует привлечению fMet-tRNK^{fMet} [23].

Б) В 2013 году было продемонстрировано в режиме реального времени встраивание флуоресцентно меченных аминокислот в растущий полипептид [85]: оказалось, что модифицированные аминокислоты (например, BODIPY-Lys-tRNK^{Lys} 576/589) хуже встраиваются в синтезируемый белок по сравнению с каноническими аминокислотами, вероятно, из-за нарушения связывания с EF-TU [86].

Более того, сравнивая три различных флуорофора (BodipyFL, Atto520 и NBD, маркирующие тиольную группу Cys-tRNK^{Cys}) (рис. 17), продемонстрировали превосходство BODIPY над остальными метками при встраивании в растущий пептид. Авторы работы подчеркнули, что подобные крупные группировки легче включаются в N-конец растущей цепи, чем в ее середину [85].

В) Реакцию транслокации изучали посредством изменения флуоресценции флуорофора MDCC, связанного с PBP (пенициллинсвязывающим белком, который связывает фосфат), при гидролизе GTP EF-G фактором. Было показано, что L7/L12 рибосомные белки стимулируют GTPase активность EF-G [87].

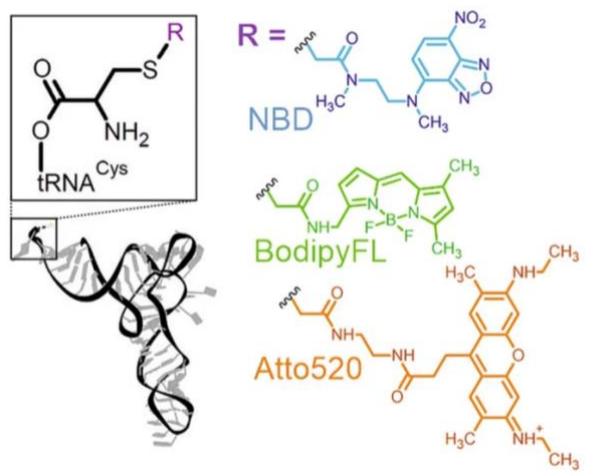


Рис. 17 Структура меченной тремя различными флуорофорами (BodipyFL, Atto520 и NBD) Cys-tRNAC^{Cys}. R – радикал (NBD, BodipyFL или Atto520).

Г) FCS – флуоресцентная корреляционная спектроскопия – помогла изучить динамику белка, его котрансляционное сворачивание за счет колебания интенсивности флуоресценции методом фотоиндуцированного переноса электронов (PET) [88] (рис. 18).

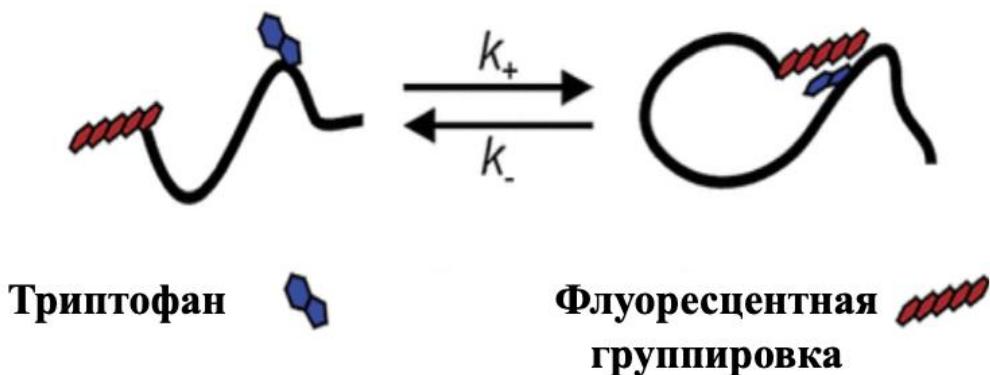


Рис. 18 Принципиальная схема измерения внутримолекулярных контактов внутри одного пептида. Флуорофор (обозначен красным цветом) присоединен к короткому гибкому пептиду на N-конце, в середине пептида встречается остаток триптофана (обозначен синим цветом). Во время сворачивания пептида флуоресценция красителя (например, MR121) эффективно гасится из-за фотоиндуцированной реакции переноса электрона при образовании ван-дер-ваальсового контакта с остатком триптофана [89]. Примечательно, что замена триптофана на фенилаланин не приводит к гашению флуоресценции.

Д) Изучение механизма трансляционного шунтирования с помощью флуоресцентно меченной инициаторной BODIPY-Met-tРНК^{fMet} [90]. Было показано, что рибосома совершает «прыжок» на 50 нуклеотидов, транслируя мРНК гена 60 Т4 бактериофага, вместо того, чтобы терминировать на стоп-кодоне (рис. 19).

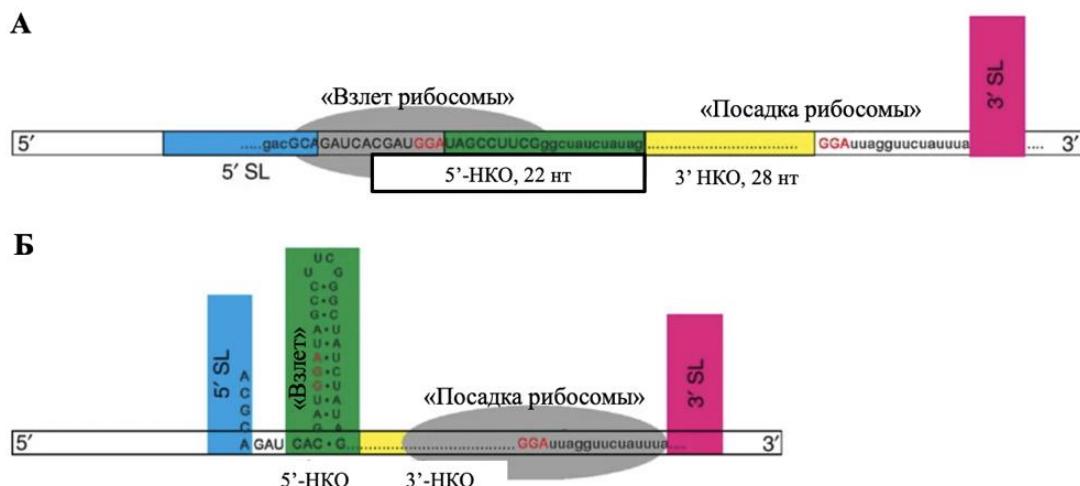


Рис. 19 Рибосома совершает «прыжок» при трансляции мРНК гена 60 Т4 бактериофага. (А) Рибосома останавливается на стоп-кодоне мРНК. (Б) Рибосома после прыжка продолжает трансляцию. 5'SL и 3'SL -петлевые структуры на 3' - и 5' - концах мРНК; 3'-НКО и 5'-НКО – 3' - и 5' - некодирующие области; серый овал – рибосома; зеленая область – область мРНК, которая сворачивается в петлевую структуру, обеспечивая прыжок рибосомы [90].

BODIPY-Met-tРНК^{fMet} применялась также для изучения эффективности образования 70S инициаторного комплекса. Так, были последовательно описаны события, составляющие инициацию трансляции (рис. 2) [19], описанные в разделе 1.0 «Обзора литературы».

1.5 Использование метода рибосомного профилирования (ribosome profiling) для изучения трансляции и котрансляционных событий

Современным методом для изучения сложных клеточных процессов является метод рибосомного профилирования, который позволяет проводить глубокий анализ трансляции *in vivo* и сопутствующих котрансляционных событий: выявлению функций основных факторов инициации, альтернативных старт-кодонов, роли 5'- и 3'- нетранслируемых областей, котрансляционного фолдинга белков, терминации и рециклирования рибосом и др. [91].

В основе метода лежит идентификация фрагментов мРНК (длиной порядка 30 нт), защищенных транслирующими рибосомами: с фрагментов мРНК методом обратной

транскрипции получают библиотеку кДНК, которую подвергают высокопроизводительному секвенированию (NGS) с последующим биоинформационическим анализом [92] (рис. 20).

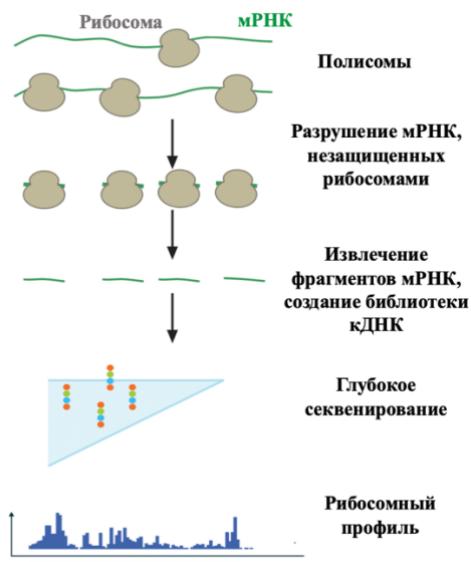


Рис. 20. Принцип метода рибосомного профилирования: извлечение мРНК, защищенных транслирующими рибосомами, создание библиотеки кДНК по извлеченным мРНК, NGS секвенирование библиотеки, создание рибосомного профиля [93].

Метод позволяет измерять уровень трансляции путем подсчета числа уникальных ридов, картированных на данный ген, позволяющих после нормализации сравнивать уровень трансляции между образцами. Сочетание рибосомного профилирования с транскриптомным и протеомным анализами способствует более широкому представлению о белках и ингибиторах, влияющих как трансляцию, так и на транскрипцию [93]. Метод имеет ряд ограничений: дороговизна используемых компонентов для приготовления библиотеки кДНК и NGS секвенирования, длительность получения результатов.

BODIPY метка

Изучение трансляционных событий оказалось бы невозможным без использования различных флуоресцентных меток, описанных подробно в разделе 1.4 «Обзора литературы»: Cy3, Cy5, ATTO520, ATTO465, NBD, MDCC, BODIPY и др. Сравнение данных красителей приведено в таблице 2.

Флуорофор	Возбуждение /излучение	Что маркируют	Недостаток	Достоинство
Cy3 [94]	Пик возбуждения – 554 нм, пик излучения – 568 нм	Нуклеиновые кислоты, белки и антитела	Слабая фотостабильность, более широкий спектр излучения (по сравнению с BODIPY), сниженное спектральное разделение	Сильная флуоресценцией в водных растворах; Универсальность маркировки
Cy5 [95]	Пик возбуждения ~ 649 нм и пик излучения ~ 667 нм	Биологическая визуализация глубоких тканей; акцептор при FRET (Донор – BODIPY) [96]	Агрегация в растворах, пониженная фотостабильность, может взаимодействовать с белками, что изменяет его спектральные характеристики	Минимальная автофлуоресценция; высокий квантовый выход
ATTO [97]	Широкий спектр	Флуоресцентные зонды в мультиплексных анализах; использование в флуоресцентной микроскопии	Высокая стоимость, по сравнению с BODIPY, неспецифическое связывание с другими молекулами; аномальная миграция при электрофорезе	Яркая флуоресценция, низкий спектр излучения (хорошее спектральное разделение), высокая фотостабильность
NBD [98]	Пик возбуждения – 467 нм, пик излучения – 538 нм	Акцептор при FRET (Донор – BODIPY); тиолы и амины; используют в флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии	Низкая флуоресценция в воде; гидрофобность	Обнаруживает малые молекулы (H_2S) или ионы металлов Hg^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} ; можно изучать динамическое поведение молекул в живых клетках
BODIPY [99]	Любой видимый свет	Маркировка белков, нуклеотидов, олигонуклеотидов и липидов.	Низкая интенсивность флуоресценции в высокополярных растворителях (воде); гидрофобность	Высокий квантовый выход, универсальность (легкость модификаций, в том числе по улучшению растворимости), узкий спектр излучения (хорошее спектральное разделение), высокая фотостабильность

Таблица 2. Сравнение характеристик флуорофоров, используемых для изучения трансляционного аппарата.

Как видно из таблицы 1, выбор флуорофоров зависит от конкретной научной задачи. Если требуется высокое спектральное разрешение и фотостабильность, то предпочтение отдают ATTO

или BODIPY красителям (красители ATTO значительно дороже BODIPY, кроме того BODIPY легко модифицируются, позволяя изменять свои спектральные и физико-химические свойства), если необходима яркая флуоресценция, то возможно использование Cy3.

Поскольку во многих работах по изучению трансляции предпочтение отдавалось именно BODIPY красителям [19], [87], [90], то вторая часть «Обзора литературы» будет посвящена разнообразию BODIPY меток и их применению. Необходимо отметить, что на основе данного флуорофора автором был разработан новый метод по изучению трансляционного аппарата, подробно описанный в разделе «Результаты и обсуждение, часть 1».

2.0 Основная информация, физико-химические свойства, путь синтеза

Синтез первого красителя BODIPY был выполнен в 1968 году [100], однако само соединение было выделено только в 2009 году [101].

По номенклатуре IUPAC название BODIPY (рис. 21): 4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен.

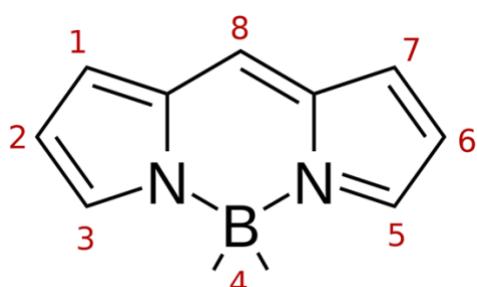


Рис. 21 Строение BODIPY флуорофора с нумерацией атомов по IUPAC [102].¹

Основной способ синтеза BODIPY включает в себя конденсацию ароматического альдегида с пирролом (имеющий свободное α -положение) с использованием кислотного катализатора, как правило, трифтторуксусной кислоты (рис.22).

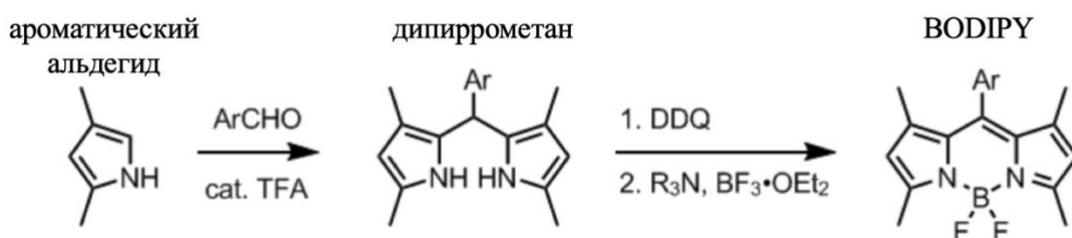


Рис. 22 Классическая схема синтеза BODIPY. ArCHO – ароматический альдегид; cat. TFA – катализатор трифторуксусная кислота; DDQ – 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон; $\text{BF}_3^*\text{OEt}_2$ – трифторида бора-диэтилового эфира; R_3N – третичный амин (обычно, триэтиламин).

¹ Позиции 3 и 5 также обычно называются « α »; 1,2,6,7 называются « β »; а 8 называется «мезо».

Также был разработан улучшенный синтез BODIPY производных [103].

Необходимо отметить, что структура BODIPY довольно подвижная: так, атомы водорода в положениях 2 и 6 циклического ядра могут быть замещены атомами галогена, а два атома фтора при атоме бора могут быть замещены алкиновыми или арильными соединениями [102], хлором или метоксигруппой [103] и др.

Незамещенный BODIPY имеет спектр поглощения в области от 420 до 520 нм (пик 503 нм) и излучения от 480 до 580 нм (пик 512 нм). Время жизни флуоресценции составляет 7,2 нс. BODIPY довольно стабильная флуоресцентная метка, сохраняющая свои свойства при температуре до 50°C [104]. BODIPY красители обладают высоким квантовым выходом флуоресценции (около 0,8). Квантовый выход – отношение испускаемых фотонов к поглощенным фотонам, отражающий эффективность флуоресцентного излучения (т.е. состояние, когда большая часть поглощённой энергии преобразуется во флуоресценцию).

2.1 Разнообразие BODIPY красителей, их использование в биомедицине и лабораторных исследованиях

BODIPY красители – это класс органических соединений, которые обладают сильным поглощением и излучением в видимом и ближнем инфракрасном спектре света. Благодаря сильной флуоресценции [105], высокой фотостабильности [106], и, кроме того, возможности модификации путем добавления различных функциональных групп (создание производных BODIPY с различными флуоресцентными свойствами), у BODIPY-красителей обширная область применения: в качестве флуоресцентных красителей в органических светодиодах [107], для мониторинга окружающей среды, контроля качества продуктов питания [108], в биологии для визуализации различных клеточных структур [109], для идентификации белков или нуклеиновых кислот [110] и даже в качестве препаратов для лечения онкологии [111].

Разнообразный цветовой спектр BODIPY красителей представлен на рис. 23, а также в приложении 1, рис. 64-68.

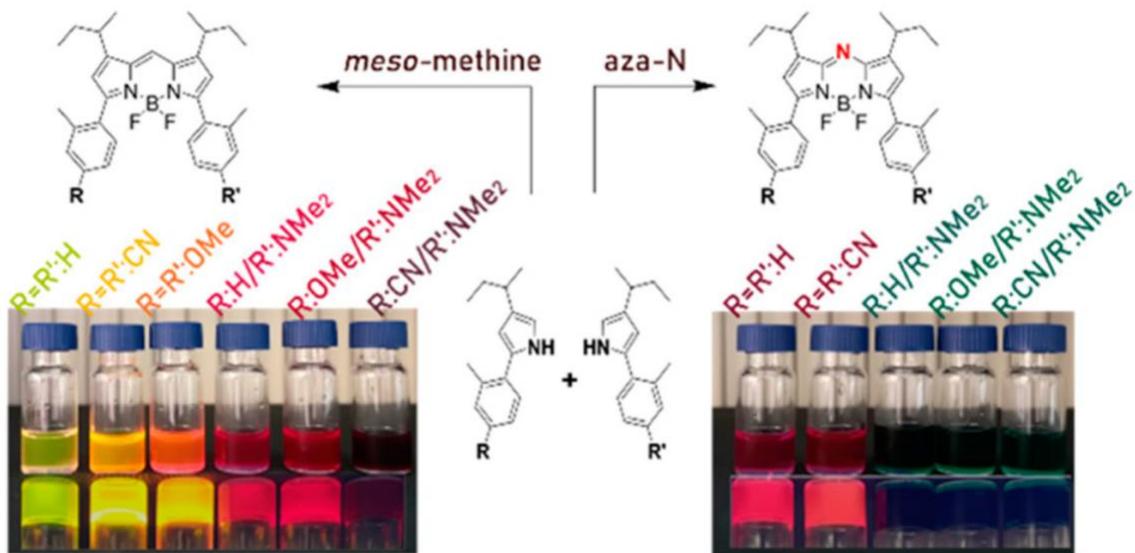


Рис. 23 Разнообразие BODIPY и aza-BODIPY¹ красителей с различными радикалами [101].

Благодаря небольшим размерам, красители BODIPY используют для биовизуализации структур и изучения молекулярных взаимодействий внутри клетки. Например, были разработаны зонды для визуализации митохондрий, лизосом, аппарата Гольджи, липидных капель и эндоплазматического ретикулума:

А. Благодаря своей амфи菲尔ной природе BODIPY красители могут проникать в клеточные мембранны [112] – что способствует окрашиванию плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума. Однако из-за способности красителей диффундировать через мембранны может окрашиваться цитоплазма. Более того, модификация структуры – добавление цепей жирных кислот – также приведет к изменению их гидрофобности и как следствие диффузии внутри клетки.

Б. Используя флуоресцентную микроскопию в сочетании с BODIPY красителями, возможно исследовать морфологию и динамику эндоплазматического ретикулума. В частности, данный метод применяется для изучения подвижности белков внутри ЭПР, механизма их синтеза и фолдинга [113]. Кроме того, aza-BODIPY красители могут дать представление о динамике ЭПР при раке и нейродегенеративных заболеваниях.

В. BODIPY-меченный сфингомиелин локализуется в различных клеточных структурах: сперва на плазматической мембране, а затем в аппарате Гольджи и лизосомных пузырьках, что делает изучение липидного метаболизма весьма удобным [114], [115].

¹ Получение aza-BODIPY, путем замены мезоуглеродного атома традиционной структуры BODIPY атомом азота (aza-N), что улучшает фотофизические характеристики красителей: расширяются спектры поглощения и испускания света (от красного до ближнего инфракрасного спектров).

Г. Для визуализации митохондрий, BODIPY красители модифицируют положительно заряженными группами, такими как трифенилфосфоний (TPP) и/или четвертичные аммониевые группы. Например, BODIPY-Mito-6 демонстрирует высокую чувствительность к изменениям митохондриального мембранных потенциала, что позволяет осуществлять мониторинг митохондриальной динамики в режиме реального времени (рис. 24).

Если необходимо визуализировать лизосомы, то красители оставляют нейтральными, не добавляя заряженные группировки.

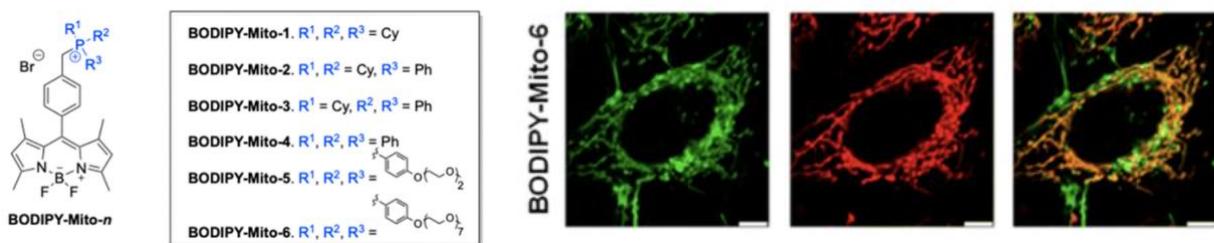


Рис. 24 Слева – химические структуры BODIPY-Mito красителей для митохондрий. Справа – изображения митохондрий, окрашенных BODIPY-Mito (зеленый цвет) и Mito Tracker (красный цвет) и их наложении (желто-оранжевый цвет), полученные с использованием конфокальной микроскопии [116].

BODIPY красители используют для фотоакустической биовизуализации (ФБ) – метода, при котором поглощенный свет преобразуется в ультразвуковые сигналы, за счет чего происходит визуализация тканей с высоким разрешением [117]. Из-за высокой флуоресценции оригинальные красители не могут быть пригодны для применения в фотоакустической биовизуализации. Однако, их модификации, такие, как конъюгация Н-пиррола – так называемые PyBODIPY красители – придают им свойства, позволяющие использовать их в ФБ: отсутствие флуоресценции, отсутствие фототоксичности, хорошая фотостабильность.

Другие примеры: А) BODIPY Na-BD краситель, конденсированный с нафталином, обладающий похожими характеристиками (и спектром поглощения в ближнем ИК-диапазоне (от 600 до 850 нм)), способствовал визуализации опухоли Нер-G2 у мышей [118] (рис. 25, А).

Б) Для BX9 и BX11 красителей (спектр поглощения 700–1000 нм) было показано их накопление в венозных сосудах и в кишечнике, что позволяет анализировать и сравнивать физиологические или патологические состояния этих органов (рис. 25, Б).

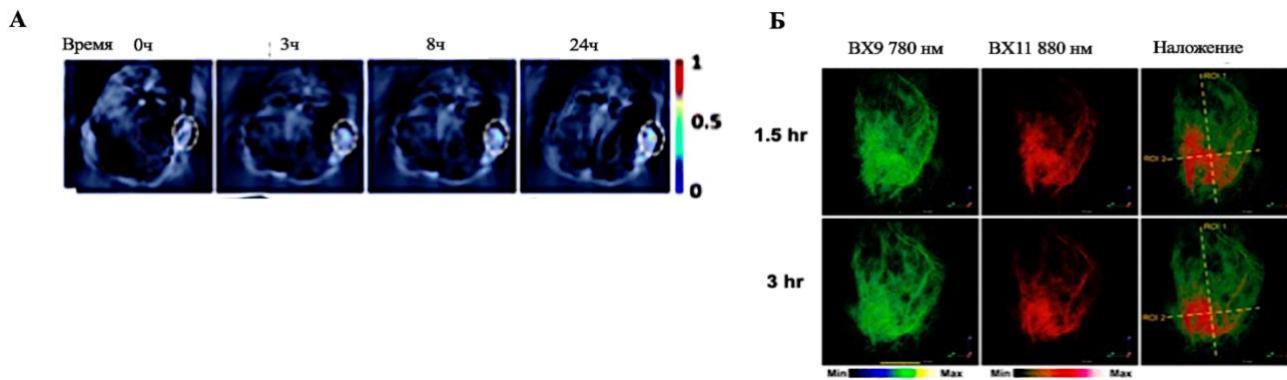


Рис. 25 Фотоакустическая биовизуализация с использованием BODIPY красителей. (А) Визуализация мышевой опухоли Нер-Г2 с помощью Na-BD. (Б) 3D-изображения (780 нм для BX9) для сосудов и (880 нм для BX11) для кишечника через 1,5 и 3 часа после введения красителей [118].

BODIPY красители успешно применяют в фотодинамической терапии для лечения рака, используя комбинацию света, фотосенсибилизирующего агента и молекулярного кислорода для уничтожения аномальных клеток [119]. Например, в работе 2017 года, модифицированный краситель – BODIPY-PDT-3, продемонстрировал повышенную эффективность в производстве синглетного кислорода, который индуцировал некроз в клетках карциномы легких Льюиса *in vitro* [120].

Еще одним важным приложением BODIPY красителей является их участие в фототермической терапии (ФТ). Метод ФТ основан на фототермическом эффекте [121]: ближний инфракрасный свет доставляется в опухолевые участки, где он поглощается фототермическими агентами, которые его преобразуют в тепло. Этот эффект приводит к локализованной гипертермии, вызывающей апоптоз и/или некроз в раковых клетках. Необходимо отметить, что температура в этот момент может превышать 50 °C - достаточной для индуцирования клеточной гибели.

Так, в работе 2024 года [122] было показано, что производное аза-BODIPY-пиразола (PY-AZB) может проникать в раковые клетки менее чем за 6 часов, с 70% эффективностью элиминации раковых клеток (рис. 26).

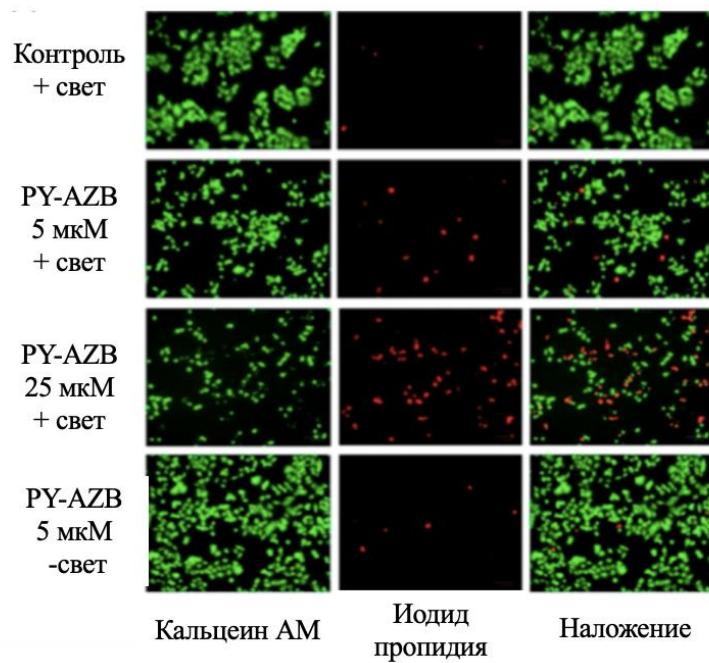


Рис. 26 Изображения опухолевых клеток, обработанных аза-BODIPY-пиразолом, полученных с помощью конфокальной микроскопии. Иодид пропидия использован для окрашивания мертвых клеток. [101].

Другой современной стратегией лечения рака является избирательное нацеливание и уничтожение раковых клеток с помощью нейтронного излучения и соединений бора: когда в опухоли локализуется достаточное количество бора, пациент подвергается воздействию нейтронного пучка (при этом низкоэнергетические тепловые нейтроны захватываются стабильными атомами бора-10). В ходе реакции $^{10}\text{B}_5 + ^1\text{n}_0(\text{th}) \rightarrow [^{11}\text{B}_5]^* \rightarrow ^4\text{He}_2 (\alpha) + ^7\text{Li}_3 + 2.38 \text{ MeV}$ происходит высвобождение ионов лития-7 и альфа-частиц (имеющих короткий диапазон действия, поэтому их влияние распространяется внутри одной раковой клетки), что способствует повреждению ДНК только в опухолевых клетках, не затрагивая при этом здоровые окружающие клетки [123] (рис. 27).

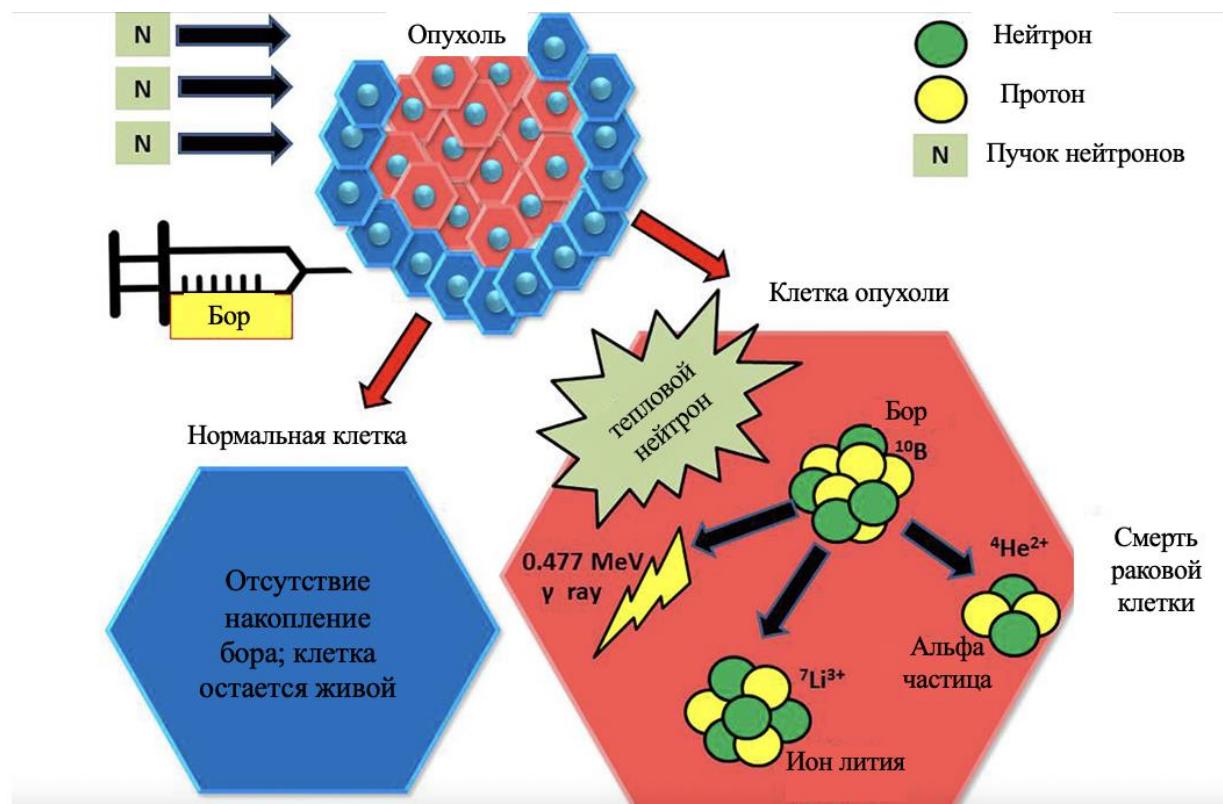


Рис. 27 Принципиальная схема бор-нейтронозахватной терапии. Введенные соединения бора обнаруживаются преимущественно в опухолевых клетках, которые подвергаются облучению тепловыми нейтронами. В результате реакции образуются альфа-частицы, которые повреждают опухолевые клетки, а также инертные ионы лития. (Адаптировано из [123]).

Основным ограничением данного метода является проходимость препаратов бора через гематоэнцефалический барьер. Разработанные растворы производных карборана-BODIPY могут служить эффективными векторами доставки бора, что делает их подходящими кандидатами для данного метода [108], [124] (Приложение 1, рис. 64-68).

Несмотря на большой потенциал BODIPY красителей и обширную область применения, их чувствительность к различным pH и полярности растворителя, гидрофобность большинства красителей и сложные пути их синтеза накладывают ограничения на визуализацию в живых клетках. Тем не менее в последние годы были разработаны наночастицы, содержащие BODIPY (BDPNP), с улучшенными характеристиками: повышенной фотостабильностью, стабильностью в водной среде (TBDP-NPs), способностью к самосборке [125].

Еще один значимый BODIPY-циклооктиновый (BDPY) краситель способен проникать через плазматическую мембрану и маркировать внутриклеточные белки (меченные реактивным аналогом метионина (Met) – азидогомоаланином (Aha) [126] в живых клетках млекопитающих [127]. Живые клетки, меченные BDPY, можно количественно охарактеризовать методом проточной цитометрии.

Кроме того, необходимо отметить разработанную коммерческую систему – FluoroTectTM GreenLys in vitro Translation Labeling System – для флуоресцентной маркировки и детекции

синтезированных *in vitro* белков, основанной на лизил-тРНК, меченной по ε -положению флуорофором BODIPY®-FL. Данная система удобна в использовании, так как совместима с различными системами трансляции Promega, а детекция меченых белков осуществляется «в геле» с помощью специального лазерного флуоресцентного гелевого сканера [128].

Подводя итог, можно сказать, что всевозможные структурные вариации BODIPY красителей/меток, благодаря своим физико-химическим особенностям (фотостабильности и высокому квантовому выходу), смогли найти свое применение в биовизуализации клеток (повышенная точность изображения), различных лабораторных методах исследования, а также диагностики и мониторинге лечения рака.

Таким образом, можно однозначно сказать, что на сегодняшний день существует множество различных способов изучать трансляционный аппарат бактерий, каждый из которых имеет ряд своих достоинств и недостатков. Кроме того нельзя забывать о глобальной проблеме распространения резистентности к антибиотикам. Именно поэтому поиск новых, изучение и модификация малоизученных ранее открытых антибиотиков становится задачей первостепенной важности. И, поскольку одной из ключевых мишеней действия антибиотиков в клетках бактерий является трансляционный аппарат, то необходимость разработки новых способов изучения механизмов действия антибиотиков и выявление влияния их на стадии биосинтеза белка являются крайне актуальными задачами, которые легли в основу данной работы.

Материалы и методы

1. Используемое оборудование

- Хроматографическое разделение проводили на колонках сорбентом LPS-500- Н.
- Аналитическая HPLC проводилась на системе Agilent 1200 (вакуумный дегазатор, четверичный насос, автосampler и диодно-матричный детектор) (Санта-Клара, Калифорния, США), оснащенной колонкой Luna C18(2) размером 4,6 × 250 мм (5 мкм) (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США).
- Определение плотности клеток проводилось на денситометре BioSan Den-1B.
- Шейкер Innova 40 (New Brunswick Scientific, США).
- Количественный анализ в микробиологических экспериментах проводился на приборе Victor X5 2030 фирмы Perkin Elmer.
- Гель-документирование проводилось на приборе ChemiDoc XRS+ (BioRad, Эстония).
- Высокоразрешающий лазерный сканер гелей GE Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, США).
- Бакетный ротор для ультрацентрифуги BECKMAN SW41 (Beckman Coulter, США), Ультрацентрифуга Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США).
- Автоматизированный хроматограф GE HEALTHCARE AKTA PURIFIER UPC 10 FPLC SYSTEM.

2. Реактивы и биопрепараты

В работе были использованы следующие реагенты: 2-меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (Serva); ампициллин, эритромицин, боррелидин, пуромицин, цистоцин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, апидацин, Tween-20, глицерол, Tris-HCl (Sigma); додецилсульфат натрия, хлориды магния и натрия, ацетат натрия, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, борная кислота, мочевина, хлорид аммония, гидроксид натрия, персульфат аммония, соляная кислота, фенол, хлороформ, диметилсульфоксид (Invitrogen), ацетонитрил (Panreac), сорбент LPS-500H (Техносорбент), [γ -³²P]-ATP с удельной радиоактивностью 4000 Кюри/ммоль (ВО Изотоп, Россия), T4- полинуклеотид киназа (Thermo Scientific), Ribolock, AMV RT (Roche), Glycoblue(Ambion), Hemo KlenTaq ДНК полимераза (New England Biolabs). В работе использовали ферменты фирм: Roche (Франция), MBI Fermentas (Литва).

3. Буферы и растворы

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

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

Буфер для культивирования *Streptomyces* sp. VKM Ac-502 (г/л): триптон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 10, дистиллированная вода - до 1 л, pH 7.4

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

TBE: 100 mM Tris-HCl; 100 mM H₃BO₃; 2 mM EDTA.

Полиакриламидные гели для разделения РНК и ДНК: 4-16% полиакриламид в смеси с бисакриламидом, 420 г/л мочевина, TBE, 0.1% персульфат аммония, 0.1% ТЕМЕД.

Буфер для нанесения продуктов обратной транскрипции: 0.1% бромфеноловый синий, 0.1% ксиленцианол, 20 mM EDTA, 98% формамид.

Формамидный краситель без ксиленцианола: 95% формамид деионизированный, 0.025% (вес/объем) бромфеноловый синий, 0.5 mM, pH 8.0 ЭДТА.

Pure System Buffer: 9 mM ацетат магния, 5 mM фосфат кальция (pH 7.3), 95 mM глутамат кальция, 5 mM NH₄Cl, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM спермидин, 8 mM путресцин, 1 mM DTT.

10x-кратный буфер для эукариотической трансляции: 200 mM Непес-КОН pH 7.6, 10 mM DTT, 5 mM спермидина-HCl, 8 mM Mg(OAc)₂, 80 mM креатинафосфата, 10 mM ATP, 2 mM GTP, 1200 mM KOAc и 250 мкМ каждой аминокислоты.

Буфер для ресуспензирования: 0.3 M ацетат натрия (pH 5.5), 5 mM EDTA, 0.5% SDS.

Буфер для переосаждения: 0.3 M ацетат натрия (pH 5.5), 5 mM EDTA.

Буфер для нанесения: 1-мл стоковый раствор содержал 980 мкл дионизованного формамида (Ambion), 20 мкл 0.5 M EDTA (pH 8.0), 1 мг бромфеноловый синий and 1 мг ксилен цианол.

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 MgCl₂

4. Используемые в работе бактериальные штаммы и клеточные линии

Штаммы *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus cereus* X1, *Lactococcus Lactis* 61, *Enterococcus faecium* 40, *Enterococcus faecalis* 125, *Macrococcus Caseolyticus* 107, *Staphylococcus epidermidis* 39, *Staphylococcus haemolyticus* 515, *Pseudomonas aeruginosa* 51911, *Streptococcus pneumonia* ATCC 6303, *Streptococcus anginosus* 213, *Streptococcus agalactiae* 3, *Streptococcus parasanguinis* 60 и *Streptococcus salivarius* 497 были предоставлены ООО «Литек» (Москва, Россия).

Штаммы *E. coli* *ΔtolC KanS*, *E. coli* *lptDmut* [67] и *E. coli* *JW5503 (ΔtolC)*, трансформированные репортерной плазмидой pDualrep2, были ранее получены в лаборатории О.

А. Донцовой, а штаммы *E. coli* *SQ110 ΔtolC*, *E. coli* BW25113 были предоставлены д.х.н. Остерманом И.А.

Штаммы *Arthrobacter sp.* ATCC 21022, *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* BL21(DE3) были приобретены у Invitrogen Corp. (Калифорния, США).

Цистоцин-продуцирующий штамм *Streptomyces sp.* VKM Ac-502 был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (www.vkm.ru).

Антибактериальная активность штаммов была оценена с помощью гиперчувствительных штаммов *E. coli ΔtolC* и *E. coli lptDmut*, трансформированных репортерной плазмидой pDualrep [129].

5. Отбор устойчивых клонов

Отбор устойчивых к терморубину клонов проводился на штамме *E. coli SQ110 lptd*, более чувствительном к антибиотикам из-за делеции в гене *lptd*. Кроме того, в данном штамме удалены 6 из 7 оперонов pPHK (в сравнении со штаммом дикого типа), что делает поиск устойчивых мутаций, возникающих в генах pPHK под действием отбора, более эффективным.

Для отбора устойчивых к антибиотику мутантов клетки *E. coli SQ110 lptd* были высеваны на агаризованную среду LB, содержащую терморубин в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл. Выделенная полногеномная ДНК из полученных в результате серии отборов клонов далее была исследована методом полногеномного секвенирования.

6. Получение матриц ДНК для BODIPY-системы

Используя плазмиду pRFPCE [130] в качестве матрицы для ПЦР-амплификации были получены ДНК-матрицы, содержащие короткие открытые рамки считывания, кодирующие M, MF, MF2, ML2, MF4 и MF6. Каждая матрица содержала T7-промотор и последовательность Шайна-Дальгарно, за которыми следовал свой набор кодонов. Например, матрица M содержала стартовый кодон (AUG), за которым сразу следовал стоп-кодон (UAA); матрица MF кодировала две аминокислоты: метионин и фенилаланин (AUG UUC), за которым следовал стоп-кодон UAA, и так далее (матрицы приведены в таблице 3, кодирующие части выделены желтым цветом).

ДНК матрица	Для чего	Последовательность нуклеотидов (5'-3')
M	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTAAG GAGACGGACGAGAGCGGCCTGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTAACGC
MF (UAA)	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTCTAA GAGACGGACGAGAGCGGCCT GGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTAACGC
MF (UAG)	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTCTAG GAGACGGACGAGAGCGGCCT GGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTAACGC
MF (UGA)	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTCTGA GAGACGGACGAGAGCGGCCT GGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTAACGC
MF2	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTCTTCTAA GAGACGGACGAGAGCGGCCT GGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCTTAACGC
ML2	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTGTTGTA GAGACGGACGAGAGCGGCCT GGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCTTAACGC
MF4	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTCTTCTTCTTCTAA GAGACGGACGAGCGGCCT GGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTAACGC
MF6	<i>BODIPY-система</i>	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGA GGAAAACAT ATGTTCTTCTTCTTCTTCTTAGGAGAC GGACGAGAGCGGCCTGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTAACGC
CER_FAM_R	<i>Обратный праймер</i>	GCGTTAAGGCTATGTACGGAACAGCTCCTCGCCCTTG
FAMnoFAM	<i>Праймер для секвенирования</i>	GCGTTAAGGCTATGTAC

Таблица 3. Используемые матрицы для тестирования в BODIPY-системе трансляции.

Кодирующие части выделены желтым цветом и жирным шрифтом.

Флуоресцентно меченая инициаторная тРНК (BPY-Met-tРНК^{fMet}), была любезно предоставлена научной группой А. Л. Коневеги.

7. *In vitro* трансляция с использованием системы из чистых компонентов (PURExpress kit)

Использовали наборы PURExpress ΔRF123 или PURExpress Δ(aa, tRNA) (NEB, США) для сопряженной транскрипции-трансляции. Реакцию проводили в 5 мкл:

- 0.5 мкл (20 нг) ДНК-матрицы (M, MF (с различными стоп-кодонами), MF2, MF4, MF6 или ML2), содержащей T7-промотор
- 0.5 мкл BPY-Мет-тРНК^{fMet} (финальная концентрация 0.2 мкМ)
- 1.5 мкл раствора А
- 1 мкл раствора В
- 0.5 мкл Ribolock (40 е.а./мкл)
- 0.5 мкл (1 мкМ) Phe-тРНК^{Phe} или 1 мкМ Leu-тРНК^{Leu} (для всех матриц, кроме M)
- 0.5 мкл (100 мкМ) Фенилаланин или Лейцин (для всех матриц, кроме M)
- 0.5 мкл раствора антибиотика или растворителя (воды)
- 0.5 мкл milli-Q

Расторы А и В из наборов PURExpress ΔRF123 или PURExpress Δ(aa, tRNA) (NEB, США), их состав не разглашается производителем (NEB, США).

Реакции проводили в течение 30 минут при 37°C, затем разделяли на две части, добавляя к одной из них 2 мкл 1 М NaHCO₃, с последующей инкубацией при 37°C в течение 20 минут, а вторую – без добавления 1 М NaHCO₃, инкубируя во льду. Для остановки обеих реакций добавляли стандартный формамидный краситель без ксиленцианола. Образцы предварительно инкубировали в течение 3 минут при 70°C, а затем визуализировали в 10% (5%, 12% или 16%) полиакриламидном денатурирующем геле (РНК ПААГ) для электрофореза с добавлением мочевины до конечной концентрации 7 М.

При изучении активности антибиотиков с использованием BODIPY-системы трансляции лимитирующим компонентом являлись рибосомы. Именно поэтому в реакционную смесь наряду с 0.1 мкМ BPY-Мет-тРНК^{fMet} добавляли 0.33 мкМ fMet-тРНК^{fMet} (последняя была предоставлена д.х.н. Остерманом И.А.), чтобы рибосомы совершили несколько раундов трансляции, преобразуя весь BPY-Мет-тРНК^{fMet} в продукты трансляции.

Все антибиотики были растворены в 10% ДМСО, концентрации исходных растворов для всех антибиотиков составляли 50 мкМ, за исключением эритромицина и этамицина, концентрация которых была 70 мкМ (исходя из данных *in vitro* трансляции, данные в работе не приведены).

Химически синтезированные пептиды BODIPY-меченные MF2 или MF4, предоставленные научной группой Н. В. Сумбатян, были нанесены на гель в концентрации 0.1 мкМ каждый в качестве положительного контроля.

Необходимо отметить, что получение ВРҮ-МР6 методом пептидного синтеза оказалось невозможным из-за его осаждения во время очистки образца.

Результаты экспериментов с использованием *in vitro* системы трансляции на основе индивидуально очищенных компонентов были получены в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги.

8. Детекция пептидов в геле

Результаты детектировали с помощью сканирования гелей в канале Cy2 с пиком возбуждения (492 нм) и пиком испускания (510 нм) на сканере флуоресценции Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, США). Все результаты были визуализированы и обсчитаны в программе ImageJ. Данные были нормированы с учетом фоновых значений.

9. Культивирование, изоляция и очистка цистоцина

Штамм *Streptomyces sp.* VKM Ac-502 культивировали в 50 мл питательной среды LB. Культивация проводилась при температуре 28 °С в течение 4 дней на термостате Innova 40 (New Brunswick Scientific, США) со скоростью 150 об/мин. Затем клетки пересевали в 150 мл среды LB и культивировали в аналогичных условиях в течение 6 дней. Штамм производил цистоцин, начиная со 2-ого дня культивирования, и достигал своего максимального производства на 6-й день культивирования.

Далее бактериальные клетки осаждали на центрифуге Sigma 3-16KL на скорости 5000 об/мин и фильтровали через мембранный фильтр МСЕ 0,47 мкм (Миллипор, Биллерики, Массачусетс, США).

Полученная культуральная жидкость была разделена с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием полимерного сорбента 7 г LPS-500-Н (сополимер дивинилбензол - гидрофильный мономер, размер пор 50–1000 Å, 70 мкм, Техносорбент, RF) с использованием перистальтического насоса (насосные системы Masterflex L/S с переменной скоростью, Masterflex, Гельзенкирхен, Германия). Экстракцию цистоцина смесью воды/ацетонитрила (MeCN) выполняли со скоростью потока 15 мл/мин в градиентном режиме от 0 до 100% ACN в течение 10 минут с использованием прибора PuriFlash 5.250 (Interchim, Montluçon, Франция). Фракции были собраны в объеме 15 мл.

Активность собранных фракций проверяли на репортерном штамме *E. coli* *ΔtolC* pDualrep2. Наибольшая активность наблюдалась во фракции, элюированной 20% MeCN.

ВЭЖХ, последующий LC-MS и ЯМР анализ были проведены в сотрудничестве с научной группой В. А. Алферовой.

Фракций ВЭЖХ, содержащая чистое активное вещество, была проанализирована с помощью LC-MS (жидкостной хроматографии-масс-спектрометрией). Структура цистоцина была подтверждена с помощью ЯМР анализа.

10. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК)

В 96-ти луночный планшет со 2-11 ряды добавляли по 100 мкл (в лунку), а в 1 ряд – 200 мкл ночной культуры штаммов *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus cereus* X1, *Lactococcus Lactis* 61, *Enterococcus faecium* 40, *Enterococcus faecalis* 125, *Macroccoccus Caseolyticus* 107, *Staphylococcus epidermidis* 39, *Staphylococcus haemolyticus* 515, *Pseudomonas aeruginosa* 51911, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303, *Streptococcus anginosus* 213, *Streptococcus agalactiae* 3, *Streptococcus parasanguinis* 60, *Streptococcus salivarius* 497, а также *E. coli* *ΔtolC KanS*, *E. coli lptDmut* и *E. coli* JW5503 (*ΔtolC*), разбавленными в 500 раз жидкой LB; в 12 (последний) ряд добавляли среду LB без бактериальных клеток в качестве отрицательного контроля. Затем в первую лунку каждого ряда добавляли по 2 мкл 50 мкг/мл тестируемого соединения, в качестве положительного контроля брали 2 мкл 50 мкг/мл эритромицина. После этого производили последовательные разведения с шагом в 2 раза: из первой лунки, где было 200 мкл, 100 мкл переносили во вторую; во второй лунке становилось 200 мкл, тогда из нее снова брали 100 мкл и переносили в третью. Процедуру осуществляли до 10-й лунки включительно (в 11-й лунке оставался контроль – LB с ночной культурой без тестируемого вещества). Планшеты культивировали ночь при 37 °С при постоянном помешивании (200 оборотов в минуту). Поглощение измеряли на приборе Victor X5 2030 (Perkin Elmer) на 590 нм. Минимальной ингибирующей концентрацией считалась та концентрация, оптическая плотность в лунке при которой не отличалась от контрольной точки, где была добавлена только среда (Выполнено в сотрудничестве с научной группой В. А. Алферовой).

11. Различные варианты *in vitro* трансляций

11.1 *In vitro* трансляция в бесклеточной системе на основе лизата *E. coli*

Для постановки реакций использовали коммерческий набор S30 Extract System for Linear Templates» Promega.

Суммарный объем реакции 5 мкл:

- 2 мкл PreS30mix, содержащего аминокислоты и нуклеотиды
- 1.5 мкл S30 экстракта *E.coli*
- 0.5 мкл смеси аминокислот 1мМ
- 0.5 мкл мРНК (Fluc 100-200 нг)
- 0.5 мкл тестируемого антибиотика (использовались различные концентрации)

- Также в реакцию добавляли субстрат D-люциферин до концентрации 0.2 мМ (0.05 мкл) и 0.1мкл ингибитора РНКаз Ribolock (40 е.а./мкл).

Постановка реакций осуществлялась на льду (без добавления мРНК), затем реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре 5 минут, по истечении которых добавляли мРНК Fluc. Трансляцию проводили в течение 30 минут на 37°C, кинетику реакций детектировали на приборе Victor X5 2030 (Perkin Elmer). Описанная методика является общей и для *in vitro* трансляция в системе из чистых компонентов.

11.2 *In vitro* трансляция в системе из чистых компонентов

Для постановки реакций использовали коммерческий набор «PurExpress» NEB.

Реакцию проводили в 5 мкл:

- 2 мкл раствор А
- 1.5 мкл раствора Б
- 0.05 мкл D-люциферин (до концентрации 0,2мМ)
- 0.1мкл ингибитора РНКаз Ribolock (40 е.а./мкл)
- 0.5 мкл milli-Q
- 0.5 мкл тестируемого антибиотика (использовались различные концентрации)
- 0.5 мкл мРНК (Fluc 100-200 нг)

Реакции проводили в течение 30 минут на 37°C.

Приготовление мРНК Fluc

T7 транскрипцию проводили при помощи набора «MEGAscript T7 Transcription Kit». Реакцию проводили в 20 мкл (По 2мкл АТФ, ЦТФ, ГТФ, УТФ (75 мМ); 2 мкл 10x реакционного буфера; 2 мкл ферментной смеси; 1 мкл ДНК (2мкг) T7-Fluc; 7 мкл milli-Q) и инкубировали 3 часа на 37 °C. К реакционной смеси затем добавляли 1 мкл TURBO DNase (2 а.е./мкл), инкубировали 37 °C на 15 минут, а после выделяли мРНК при помощи набора «PureLinkTM RNA Mini Kit», согласно протоколу. Концентрацию РНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop. Полученную мРНК Fluc разбавляли до 100 и 200 нг/мкл. мРНК проверяли при помощи набора «E. coli S30 Extract System for Linear Templates» Promega для *in vitro* трансляции.

11.3 *In vitro* трансляция в системе на основе экстрактов клеток НЕК293Т

Для тестирования соединений в системе трансляции млекопитающих *in vitro* использовались экстракты клеток НЕК293Т, предоставленные к.х.н. Е. С. Комаровой.

Реакции проводили в 10 мкл:

- 5 мкл экстракта HEK293T [131]
- 1 мкл 10-кратного буфера для трансляции (10-кратный буфер для эукариотической трансляции, «Материалы и методы», 3. Буфера и растворы),
- 0.05 мкл ингибитора RNase RiboLock (Thermo Scientific, США) (40 е.а./мкл),
- 0.5 мМ D-люциферины (Promega),
- 1 мкл раствора антибиотика или растворителя (вода)
- 50 нг кэпированной и полиаденилированной мРНК Fluc (предоставленной к.х.н. Е. С. Комаровой)

Готовую реакционную смесь (без мРНК), приготовленную на льду, инкубировали 5 минут при 30 °C. После добавления мРНК реакционную смесь переносили в предварительно разогретую 384-луночную плашку FB/NB (Grenier no 781904). Реакции проводили с использованием прибора Victor X5 2030 (Perkin Elmer) при 30 °C с непрерывным измерением активности люциферазы в течении 1 часа.

11. 4 *In vitro* трансляции «канонических» и «безлидерных» мРНК

С помощью ПЦР были получены две ДНК-матрицы:

1) «Каноническая матрица»: содержит T7-промотор (желтый цвет), 27-нт лидер (5'-НТО) (зеленый цвет), полноразмерный ген *fLuc* и 30-нт 3'-НТО (голубой цвет).

2) «Безлидерная матрица»: не содержит 5'-НТО, за T7-промотором (желтый цвет) сразу следует полноразмерный ген *fLuc* и 30-нт 3'-НТО (голубой цвет) (таблица 4).

In vitro сопряженная транскрипция-трансляция проводилась в системе из чистых компонентов PURExpress (New England Biolabs). Ингибирование синтеза белка на мРНК с и без 5'-НТО происходило при наличии и без терморубина на 37°C в течение 40 минут.

В качестве отрицательного контроля использовали 1% ДМСО, для терморубина были выбраны концентрации, соответствующие 0,5x МИК (3.10 мкг/мл), 1x МИК (6.25 мкг/мл) и 10x МИК (62.5 мкг/мл). Активность люциферазы измерялась с помощью прибора Victor X5 2030 (Perkin Elmer).

ДНК матрица	Для чего	Последовательность нуклеотидов (5'-3')
Каноническая <i>luc</i>	<i>In vitro</i> трансляция	<p>TAATACGACTCACTATAAGGGTCTGACCGCGGAGAGGAGAT ATCATATGAAAGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAGGCC CGGCGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAGA GCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTCCT GGAACAATTGCTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACA TCACGTACCGGAATACTCGAAATGTCCGTCGGTTGGC AGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAG AATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCATTCTTATGC CGGTGTTGGCGCGTTATTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCC GCGAACGACATTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTA TGAACATTTCGCAGCCTACCGTAGTGTGTTCCAAAAAG GGGTTGCAAAAAATTGAAACGTGCAAAAAAAATTACCAA TAATCCAGAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTA CCAGGGATTTCAGTCGATGTACACGTTCGTCACATCTCATC TACCTCCCGGTTTAATGAATACGATTGTACCAAGAGTCC TTTGATCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAATTCTC TGGATCTACTGGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCTCCGCATA GAACTGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATT TTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTAAAGTGT TGTTCCATTCCATCACGGTTTGAATGTTACTACACTCG GATATTGATATGTGGATTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGA TTTGAAGAAGAGCTGGTTTACGATCCCTCAGGATTACAA AATTCAAAGTGCCTGCTAGTACCAACCCATTTCATTCT TCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTATCTAA TTTACACGAAATTGCTCTGGGGCGCACCTCTTCGAAAG AAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATCTCCAGG GATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCT ATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCG TCGGTAAAGTTGTCATTGAGACCTATGATTATGTCCGGTTATGT CTGGATACCGGAAAACGCTGGCGTTAATCAGAGAGGC GAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGTTATGT AAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGAT GGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAG ACGAACACTTCTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCTTAATT AAATACAAAGGATATCAGGTGGCCCCCGCTGAATTGGAAAT CGATATTGTTACAACACCCCAACATCTCGACGCCGGCGT GGCAGGTCTCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCGCC GCCGGTTGTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAA AAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGC GAAAAAAGTGCAGGAGGAGTTGTGTTGGACGAAGTA CCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATC AGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCC AAATTGTAACACGTGCTCGAGTAAGGTTAACCTGCAGGA</p>

Продолжение таблицы 4 на следующей странице.

ДНК матрица	Для чего	Последовательность нуклеотидов (5'-3')
Безлидерная <i>luc</i>	<i>In vitro</i> трансляция	<p>TAATACGACTCACTATAGATGAAAGAAGACGCCAAAAAC</p> <p>ATAAAGAAAGGCCGGCGCCATTCTATCCTCTAGAGGAT</p> <p>GGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAG</p> <p>ATACGCCCTGGTTCCCTGGAACAAATTGCTTTACAGATGCA</p> <p>CATATCGAGGTGAACATCACGTACCGGAATACTCGAA</p> <p>ATGCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGG</p> <p>CTGAATACAAATCACAGAACATCGCTATGCAGTAAAAAC</p> <p>TCTCTCAATTCTTATGCCGGTGGCGCGTTATTAT</p> <p>CGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTATAATGA</p> <p>ACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACACATTTCGCAGCCTAC</p> <p>CGTAGTGTGTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTG</p> <p>AACGTGCAAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATT</p> <p>ATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTCAGTCG</p> <p>ATGTACACGTTCGTCACATCTCATCTACCTCCGGTTTA</p> <p>ATGAATACGATTTGTACCAAGACTCCTTGATCGTGACAA</p> <p>AACAATTGCACTGATAATGAATTCTCTGGATCTACTGGG</p> <p>TTACCTAAGGGTGTGGCCCTCCGCATAGAACTGCCTGCG</p> <p>TCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTGGCAATCA</p> <p>AATCATTCCGGATACTGCGATTAAAGTGTGTTCCATT</p> <p>CATCACGGTTTGGAAATGTTACTACACTCGGATATTGA</p> <p>TATGTGGATTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTGAAGA</p> <p>AGAGCTGTTTACGATCCCTCAGGATTACAAAATTCAA</p> <p>AGTGCCTGCTAGTACCAACCTATTTCATTCTCGCCA</p> <p>AAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTATCTAAATTACA</p> <p>CGAAATTGCTTCTGGGGCGCACCTCTTCGAAAGAAGT</p> <p>CGGGGAAGCGGTTGCAAAACGCTCCATCTCCAGGGAT</p> <p>ACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTAT</p> <p>TCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGT</p> <p>CGGTAAGTTGTCATTGGAAAGCGAAGGTTGTGGAT</p> <p>CTGGATACCGGAAAACGCTGGCGTTAATCAGAGAGGC</p> <p>GAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGTTATG</p> <p>TAACAAATCCGAAGCGACCAACGCCCTGATTGACAAGG</p> <p>ATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTACTGGACG</p> <p>AAGACGAACACTCTTCATAGTTGACCGCTGAAGTCTT</p> <p>AATTAATACAAAGGATATCAGGTGGCCCCGCTGAATT</p> <p>GGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTCGACGC</p> <p>GGCGTGGCAGGTCTCCGACGATGACGCCGGTGAAC</p> <p>TCCCGCCGCCGTTGGAGCACGGAAAGACGAT</p> <p>GACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCCAGTCAGT</p> <p>AACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGAGGAGTTGTGTTGT</p> <p>GGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGC</p> <p>AAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGG</p> <p>GCGGAAAGTCCAAATTGTAACACGTGCTCGAGTAAGGTT</p> <p>AACCTGCAGGA</p>

Таблица 4. Каноническая (T7-промотор обозначен желтым цветом, 27-нт лидер (5'-НТО) – зеленым цветом, 30-нт 3'-НТО – голубым цветом) и безлидерная матрицы (T7-промотор обозначен желтым и 30-нт 3'-НТО – голубым цветом) для *in vitro* трансляции.

12. Профилирование рибосом в градиенте сахарозы

Ночную культуру штамма *E. coli* JW5503 *ΔtolC (KanR)*, инкубированную при 37°C, разбавили 1:100 в 30 мл LB. Затем разбавленные клеточные культуры подращивали до лог-фазы при 37°C, до добавления терморубина в концентрации 10x МИК (62.5 мкг/мл). После добавления антибиотика культуры инкубировали при 37°C в течение 1 часа.

В качестве отрицательного контроля использовали 1% ДМСО. Клетки осадили центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Клеточный осадок лизировали с помощью последовательных процедур замораживания-оттаивания в жидком азоте с использованием лизис буфера, содержащего лизоцим. Для прекращения лизиса клеток добавляли 10% дезоксихолат натрия (15 мкл). Далее клеточный лизат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Полученные супернатанты разбавляли milli-Q в 100 раз и переносили в чистые пробирки объемом 1,5 мл. Для оптимизации и расчета необходимого объема образца были определены значения поглощения при 260 нм. 13.8 единиц (A260) каждого образца были наслойены на 11-мл 10–40% сахарозный градиент и центрифугированы при 35000 об/мин в течение 4 часов при 4°C с использованием ротора SW41 (Beckman Coulter, США).

Детекция рибосомного профиля происходило на 254 нм с использованием ÄKTA Purifier в качестве УФ-детектора непрерывного потока (GE Healthcare, США). Для количественного анализа наблюдаемых пиков использовали программное обеспечение UNICORN (GE Healthcare, США). Эксперимент был проведен в трех повторностях.

13. МТТ-тест на цитотоксичность

Анализ на цитотоксичность был проведен совместно с Зотовой Полиной с использованием клеточной линии HEK293T на Victor X5 2030 (Perkin Elmer). Цитотоксическая концентрация антибиотика (IC50) соответствовала концентрации, при которой цитотоксический эффект индуцировался у 50% клеток. В качестве положительного контроля использовали доксорубицин.

14. Toe-print анализ

Подготовка матриц для toe-print анализа.

ДНК-матрицы генов *rst1*, *rst2* и *ermBL* были получены путем отжига длинных перекрывающихся олигонуклеотидов (выделены голубым цветом), а затем амплификации методом ПЦР с использованием праймеров T7 (выделен желтым цветом) и NV1 (выделен зеленым цветом) (таблица 5). Toe-print анализ с использованием ДНК-матрицы гена *yrbA* был осуществлен научной группой М. Г. Гагнан.

Матрица для toe-print	Название праймера	Применение	Последовательность нуклеотидов (5'-3')
<i>rst1</i>	RST1-Fwd	ПЦР	TAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAG GAGGAAAAACATATGAAATTGCCATCACCTG CGTCAGTGCAGAAGGCTGGTCACC
	RST1-Rev	ПЦР	GGTTATAATGAATTTGCTTATTAAACGATAGAA TTCTATCACTTTTTTATTATTAAATTGTCATAAT GTACCGGTGACCAAGCCTTCGCAC
<i>rst2</i>	RST2-Fwd	ПЦР	TAATACGACTCACTATAGGAAGTATAAGGAG GAAAACATATGTATTGGGTAAACCTCACGTCAG CCGAATATGCTAAAATCCATGGCT
	RST2-Rev	ПЦР	GGTTATAATGAATTTGCTTATTAAACGATAGAA TTCTATCACTTTTTTATTATTAGGCGCAGTCTT CGAAGCCATGGATTTCAGCATA
<i>ermBL</i>	ErmB3-Fwd	ПЦР	TAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAG GAGGAAAAAAATATGTTGGTATTCCAAATGCGT AATGTAGATAAAACATCTAC
	ErmB3-Rev	ПЦР	GGTTATAATGAATTTGCTTATTAAACGATAGAA TTCTATCACTTATTCAAAATAGTAGATGTTT ATCTACATTACG
	T7	ПЦР	TAATACGACTCACTATAGGG
	NV1	ПЦР Toe-print	GGTTATAATGAATTTGCTTATTAAAC

Таблица 5. Использованные в toe-print анализе матрицы. Перекрывающиеся последовательности олигонуклеотидов выделены голубым цветом, T7 праймер – желтым цветом и NV1 праймер – выделен зеленым цветом.

RST1 (синтетический ген, кодирующий 21 кодон: инициаторный кодон и по одному кодону каждой аминокислоты)

5' -

TAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAACATATGTATTGGGTAA
ACCTCACGTCAGCCGAATATGCTAAAATCCATGGCTCGAAGACTGCGCCTAATAATAAA
TAAAAAAAAGTGATAGAATTCTATCGTTAATAAGCAAAATTCAATTATAACC- 3'

Праймер: 5' - GGTTATAATGAATTTGCTTATTAAAC- 3'

RST2 (синтетический ген, кодирующий 20 кодонов: инициаторный кодон и по одному кодону каждой аминокислоты, за исключением метионина)

5' -

TAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAACATATGAAATTGCC
ATCACCCCTGCGTCAGTGCAGAAGGCTGGTCACCGGTACATTATGACAATTAAATAATAAA
AAAAAGTGATAGAATTCTATCGTTAATAAGCAAAATTCAATTATAACC- 3'

ErmBL (лидерный пептид, располагающийся перед геном устойчивости к макролидами (ermB)).

5' -

TAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAAATATGTTGGTATTCC
AAATGCGTAATGTAGATAAAACATCTACTATTTGAAATAAGTGATAGAATTCTATCGTT
AATAAGCAAAATTCAATTATAACC- 3'

Toe-print анализ проводили в соответствии с протоколом, описанным [67].

1) Праймеры были помечены $[\gamma-^{32}\text{P}]$ АТФ с использованием полинуклеотид киназы (ThermoFisher, США) в соответствии с протоколом производителя.

2) Сопряженная *in vitro* транскрипция-трансляция была выполнена с помощью набора для синтеза PURExpress® In VitroProtein (New England Biolabs, США) в 5 мкл: 2 мкл раствора A, 1 мкл раствора B, 0.2 мкл RiboLock (ThermoFisher, США) (40 е.а./мкл), 0.5 мкл тестируемого антибиотика или milli-Q, 0.5 мкл ДНК матрицы (0.2 ммоль/мл) и 0.5 мкл радиоактивно меченного праймера. Для некоторых реакций дополнительно добавляли 50 мкМ боррелидина (для осуществления остановки рибосом на треониновом кодоне) или токсин RelE (для разрезания свободной мРНК в A-сайте рибосомы). Смесь инкубировали 30 минут при 37°C.

3) Далее добавляли 1 мкл смеси для обратной транскрипции Titan One Tube RT-PCR System (Roche, Швейцария). Обратную транскрипцию проводили в течение 15 минут при 37 °C.

4) Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10 M NaOH с последующей инкубацией при 37 °C в течение 15 минут.

5) Затем добавляли 1 мкл 10 M HCl для нейтрализации образцов и 200 мкл ресуспендирующего буфера.

6) Очистку полученных продуктов реакции проводили с помощью набора QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Германия), в соответствии с протоколом производителя.

7) Сиквенсные реакции были подготовлены с использованием коммерческого набора USB® Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) в соответствии с протоколом производителя.

8) Электрофорез кДНК (Продукты реакции и сиквенсные образцы) проводился в 6%-ном ПААГ ($60 \times 40 \times 0,03$ см), 1% (w/v) N,N'-метиленбисакриламида и 7 M мочевину, в ТВЕ-буфере в течении 2-3 часов (мощность тока 10W первые 30 минут и 37W в оставшееся время).

9) Далее гель переносили на 3-миллиметровую бумагу, высушивали и экспонировали в течение 18 часов в специализированных кассетах фирмы GE. Сканирование кассеты осуществляли с помощью Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager (GE Healthcare, США).

15. Анализ механизма действия антибиотиков с использованием двойной репортерной системы DualRep2

Штаммы *E. coli* (JW5503 *ΔtolC* и *lptDmut*), трансформированные репортерной плазмидой pDualrep2 [132], были использованы для оценки антибактериальной активности. Ночная культура репортерных штаммов, культивированная при 37 °C, была разбавлена свежеприготовленной средой LB до оптической плотности 600 нм (OD600) 0.05–0.1. Разбавленные культуры были перенесены на агаризованные чашки Петри, содержащие 100 мкг/мл ампициллина (для JW5503 *ΔtolC* штамма) или 50 мкг/мл канамицина (для JW5503 *lptDmut* штамма). Поверх газона клеток репортерных штаммов добавляли 1 мкл соединений Цистоцин (Cst) и Пуромицин (Puro) в концентрации 20 мг/мл или Терморубина (Thr) в концентрации 10 мг/мл. Эритромицин (Ery, 5 мг/мл), ципрофлоксацин (Cip, 10 мкг/мл) или левофлаксоцин (Lev, 25 мг/мл) использовали в качестве контрольных антибиотиков. Агаризованные чашки Петри инкубировали в течении 16 часов при 37 °C. Результаты визуализировали с использованием флуоресцентного сканера ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, США) в каналах Cy3 (для TurboRFP) и Cy5 (для Katushka2S).

Конечные концентрации антибиотиков, используемые в toe-print анализе были: 50 мкМ терморубин (Thr), 50 мкМ апидацин (Api), 50 мкМ ретапамулин (Ret), 50 мкМ эритромицин (Ery), 50 мкМ тиострептон (Ths), 50 и 5 мкМ цистоцина (Cst) и 25 и 2.5 мкМ пуромицина (Puro).

Определение рентгеновской кристаллографической структуры (с использованием рибосом 70S дикого типа из *T. thermophilus* (штамм HB8) и синтетической мРНК с последовательностью 5'-GGC-AAG-GAG-GUA-AAA-AUG-UAA-3'), подготовка образцов для крио-ЭМ, сбор данных и обработка изображений, моделирование и уточнение рибосомы *E. coli* 70S, а также построение и сборка структурных моделей с помощью программного обеспечения PyMol (www.pymol.org), UCSF Chimera 1.14 (38) или Chimera X 1.2 (41) Adobe Illustrator (Adobe Inc.) были выполнены в сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона.

Подготовка образцов для быстрых измерений кинетики, быстрые измерения кинетики, а также А-сайтовые измерения константы диссоциации пептидил-тРНК были выполнены в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги.

Результаты и обсуждение

Часть 1. Создание BODIPY-системы

1.0 Введение

В ранее опубликованных работах было показано, что BODIPY-меченные пептиды возможно визуализировать с применением полиакриламидного денатурирующего трис-ацетатного геля для электрофореза РНК в кислых условиях (рН 5.7) или же с помощью более распространенного способа визуализации BODIPY-меченных белков (более 1 кДа) - в трис-трициновом РНК ПААГ [133]. Однако, данные методы не позволяют разделять короткие пептиды или отслеживать этапы инициации трансляции, переноса пептида, транслокации и терминации трансляции с разрешением до одной аминокислоты, как это возможно в разработанной BODIPY-системе трансляции. BODIPY-система трансляции позволяет визуализировать короткие пептиды длиной от 1 до 7–8 аминокислот, отслеживать влияние на каждый этап биосинтеза белка антибиотических веществ для более детального изучения механизма их действия.

Для создания подобной системы необходима синтезированная BPY-Met-tРНК^{fMet}, которая была предоставлена научной группой А. Л. Коневеги (рис. 28).

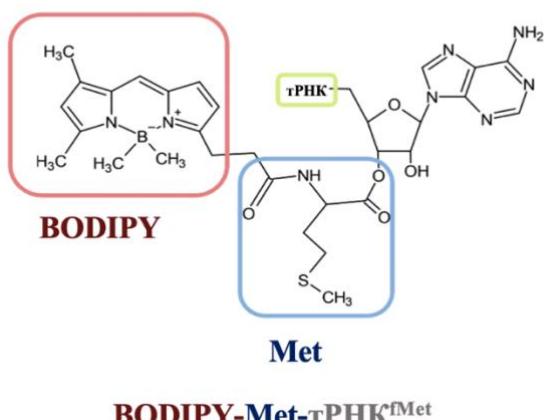


Рис. 28 Схема строения инициаторной BPY-Met-tРНК^{fMet}.

Данный метод имеет ряд важных преимуществ: он прост в использовании, требует стандартных лабораторных реактивов и оборудования (электрофорез, полиакриламидный гель для электрофореза РНК), помогает быстро визуализировать продукты реакции.

1.1 Визуализация коротких пептидов длиной от 1 до 7 аминокислот в денатурирующем РНК ПААГ с мочевиной

Изначально стояла задача визуализировать различные пептиды, меченные BODIPY, с помощью гель-электрофореза. Исходную BPY-Met-tРНК^{fMet} в виде тонкой полосы возможно детектировать в денатурирующем РНК ПААГ с мочевиной (рис. 29, дорожка BPY-Met-tРНК^{fMet}). Однако при использовании BPY-Met-tРНК^{fMet} в качестве инициаторной тРНК в коммерческом наборе для сопряженной транскрипции-трансляции (PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB)), а также ДНК-матрицы, описанные в разделе «материалы и методы»: M (ATG TAA); MF (ATG TTC TAA); MF₂ (ATG (TTC)₂ TAA); MF₄ (ATG (TTC)₄ TAA); и MF₆ (ATG (TTC)₆ TAA), - в РНК ПААГ были обнаружены полноразмерные продукты трансляции - M, MF, MF₂, MF₄, MF₆, меченные BODIPY (рис. 29, дорожки M, MF, MF₂, MF₄, MF₆).

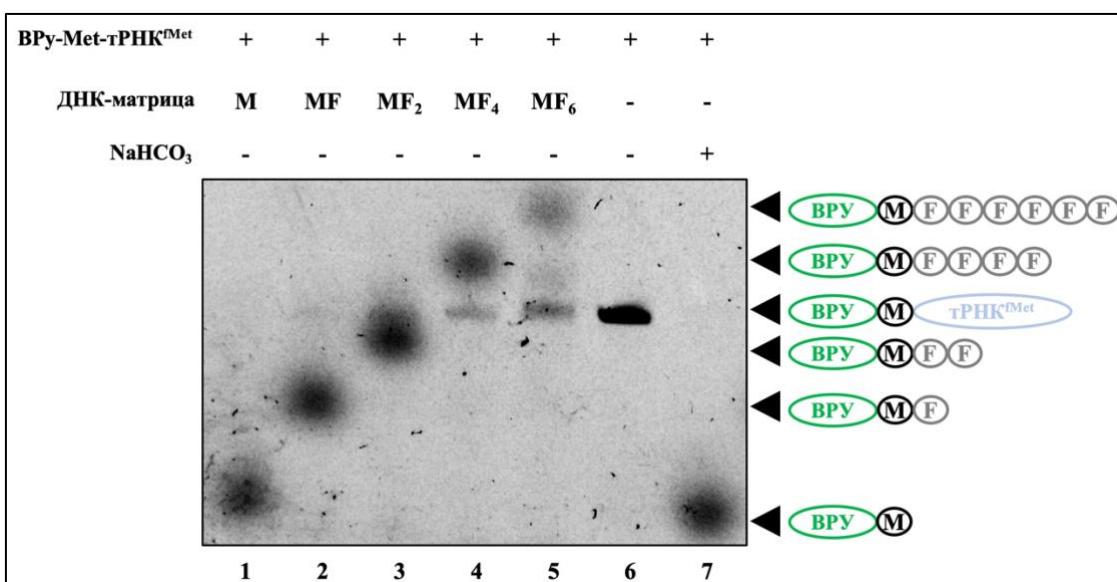


Рис. 29 Визуализация синтезированных полноразмерных пептидов, меченных BODIPY, в системе для сопряженной транскрипции-трансляции с использованием ДНК-матриц (использован PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB)). Продукты синтеза обозначены стрелками. Исходный BPY-Met-tРНК^{fMet} соответствует дорожке 6, а дорожка 7 содержит BPY-Met, образующийся после гидролиза сложноэфирной связи с помощью 1 M NaHCO₃. Дорожки 1–5 соответствуют продуктам трансляции: M, MF, MF₂, MF₄ и MF₆. BPY обозначен зеленым овалом – метка BODIPY; черным кружком – остаток метионина (M); серыми кружками – остатки фенилаланина (F); синим овалом – тРНК^{fMet}.

Как можно видеть, подвижность пептидов уменьшается с увеличением их длины. Благодаря аномальной подвижности BODIPY-меченные пептиды в РНК ПААГ оказалось возможным их разделение с помощью обычного гель-электрофореза. Более того, в РНК ПААГ с мочевиной отсутствует SDS, необходимый для денатурации и создания заряда белковых цепей в случае разделения пептидных продуктов [134].

Также необходимо отметить, что MF₄ и MF₆ продукты образуются с меньшей эффективностью, чем M, MF, MF₂, вероятно потому, что фенилаланин является лимитирующим

компонентом в данной реакции и/или контекст кодонов играет важную роль [135]. Другим возможным объяснением может быть то, что более длинные матрицы в принципе сложнее транслировать, чем короткие.

1.2 Время синтеза продукта в системе

Используя коммерческие наборы для сопряженной транскрипции-трансляции PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB) и MF2 ДНК матрицу (ПЦР-продукт), подробно описанные в разделе «Материалы и методы», были подобраны условия, в которых наиболее эффективно происходит образование полноразмерного синтезированного продукта - короткого пептида MF2, меченного BODIPY (рис. 30).

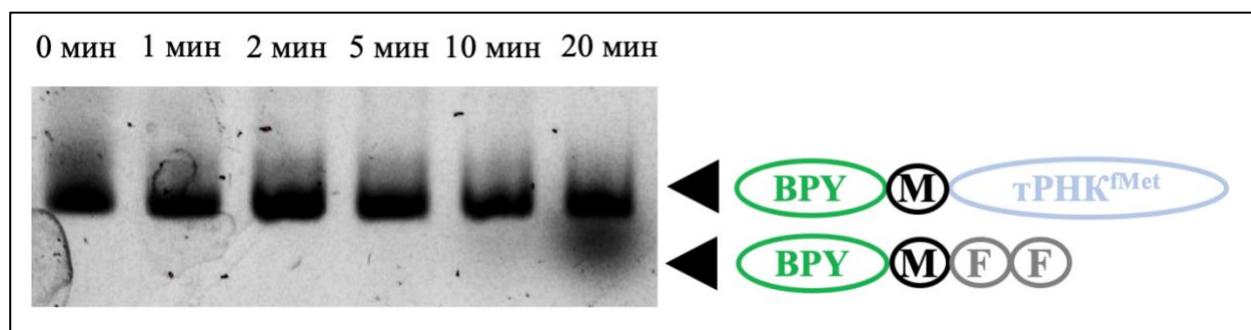


Рис. 30 Зависимость образования MF2 продукта от времени. BPY обозначен зеленым овалом – метка BODIPY; черным кружком – остаток метионина (M); серыми кружками – остатки фенилаланина (F); синим овалом – tPHK^{fMet}.

Как видно, полноразмерный продукт образовывается лишь спустя 20 минут, поэтому было решено проводить реакцию в течение 30 минут для полного истощения исходной BODIPY-Met-tPHK^{fMet} и синтеза полноразмерного MF2 пептида.

1.3 Способы гидролиза эфирной связи для визуализации пептидных продуктов, меченых BODIPY

После подбора условий для синтеза полноразмерных пептидных продуктов необходимо было также выбрать метод гидролиза сложноэфирной связи между меченным BODIPY - пептидом и tPHK. До гидролиза синтезированные продукты, связанные с tPHK невозможно различить между собой (рис. 31 дорожки, соответствующие продуктам трансляции с использованием коммерческого набора PURExpress® Δ RF123 Kit без факторов терминации до и после обработки 1 M NaHCO₃).

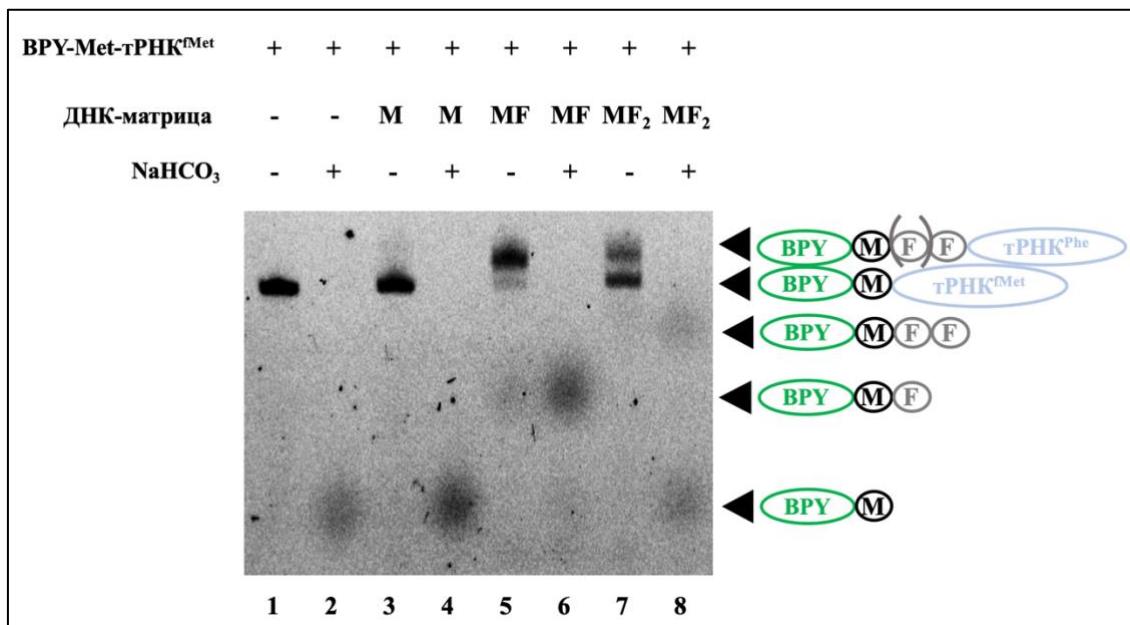


Рис. 31 Синтезированные пептиды, присоединенные к тPHK, возможно различить с помощью электрофореза в PHK ПААГ с мочевиной до и после гидролиза 1 М NaHCO₃ (использован коммерческий набор PURExpress® Δ RF123 Kit). Продукты трансляции показаны черными стрелками. Исходная BPY-Met-tPHK^{fMet} (дорожка 1), продукты трансляции после гидролиза – M (дорожка 4), MF (дорожка 6) и MF2 (дорожка 8), BPY-Met-tPHK^{fMet} (3), BPY-MF-tPHK^{phe} (5), BPY-MF2- tPHK^{phe} (7). BPY обозначен зеленым овалом – метка BODIPY; черным кружком – остаток метионина (M); серыми кружками – остатки фенилаланина (F); синим овалом – tPHK^{fMet} или tPHK^{phe}.

Для осуществления гидролиза сложноэфирной связи были протестированы 4 различных агента : Tris (pH 9,0), Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaHCO₃ и 1 M Na₂CO₃ (рис. 32).

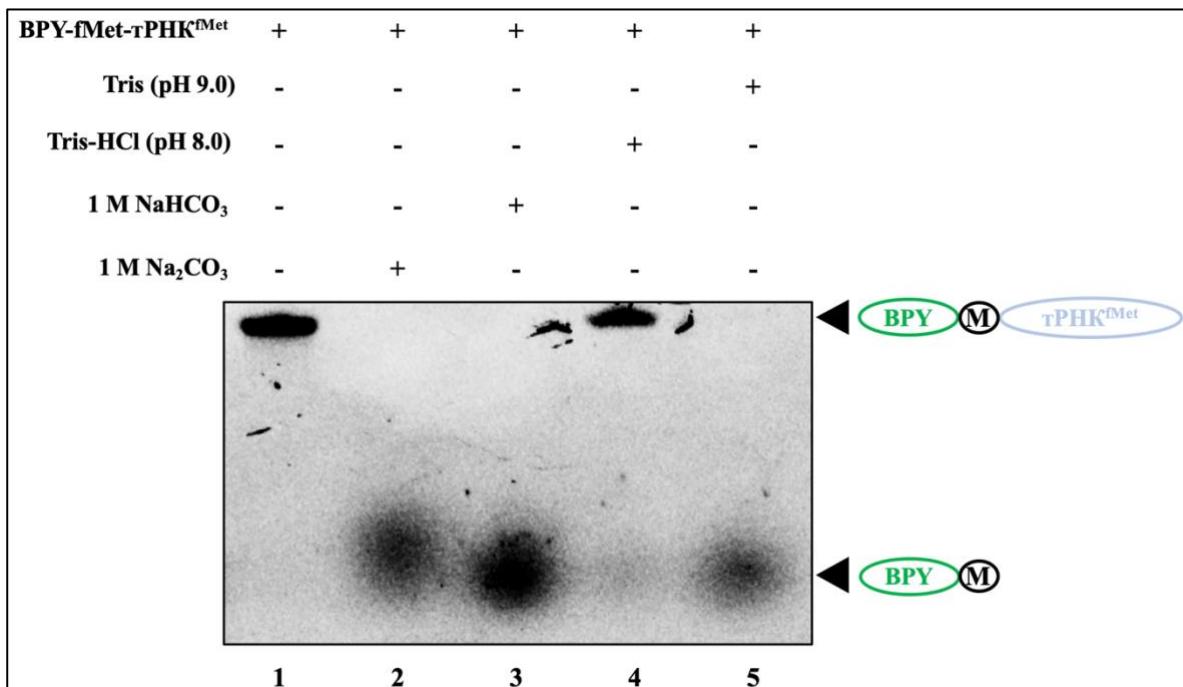


Рис. 32 Варианты условий щелочного гидролиза BPY-Met-tPHK^{fMet}. Исходная BPY-Met-tPHK^{fMet} (дорожка 1); гидролиз с помощью 1 M Na₂CO₃ (дорожка 2), 1 M NaHCO₃ (дорожка 3), Tris-HCl (pH 8.0) (дорожка 4) и Tris (pH 9.0) (дорожка 5). BPY обозначен зелёным овалом — метка BODIPY; чёрным кругом — остаток метионина (M); синим овалом — tPHK^{fMet}.

Кроме того, в качестве реагента был выбран NaOH, однако использование даже 0.1M NaOH, приводил к полному разрушению метки.

Известно, что существует зависимость гидролиза сложноэфирной связи от значений pH: степень гидролиза постепенно уменьшается по мере снижения pH [133]. Гидролиз проводили в течение 20 минут на 37°C. Наибольшую эффективность показали агенты 1 M Na₂CO₃, Tris (pH 9.0) и 1 M NaHCO₃, последний оказалась самым оптимальным из-за отсутствия влияния на деградацию высвободившегося продукта синтеза (так как 1M Na₂CO₃ или Tris (pH 9.0) приводили к частичной деградации метки (это можно заметить по более размытому пятну на геле, соответствующему BODIPY-Met)).

1.4 Верификация продуктов синтеза при помощи РНК ПААГ

Безусловно, необходимо было подтвердить подлинность визуализируемых продуктов реакции. Для этого в сотрудничестве с научной группой Н. В. Сумбатян были химически синтезированы MF2 и MF4-меченные BODIPY пептиды. Химически синтезированные пептиды и продукты реакции (MF2 и MF4), образованные в системе для сопряженной транскрипции-трансляции были нанесены на денатурирующий РНК ПААГ с мочевиной (рис. 33).

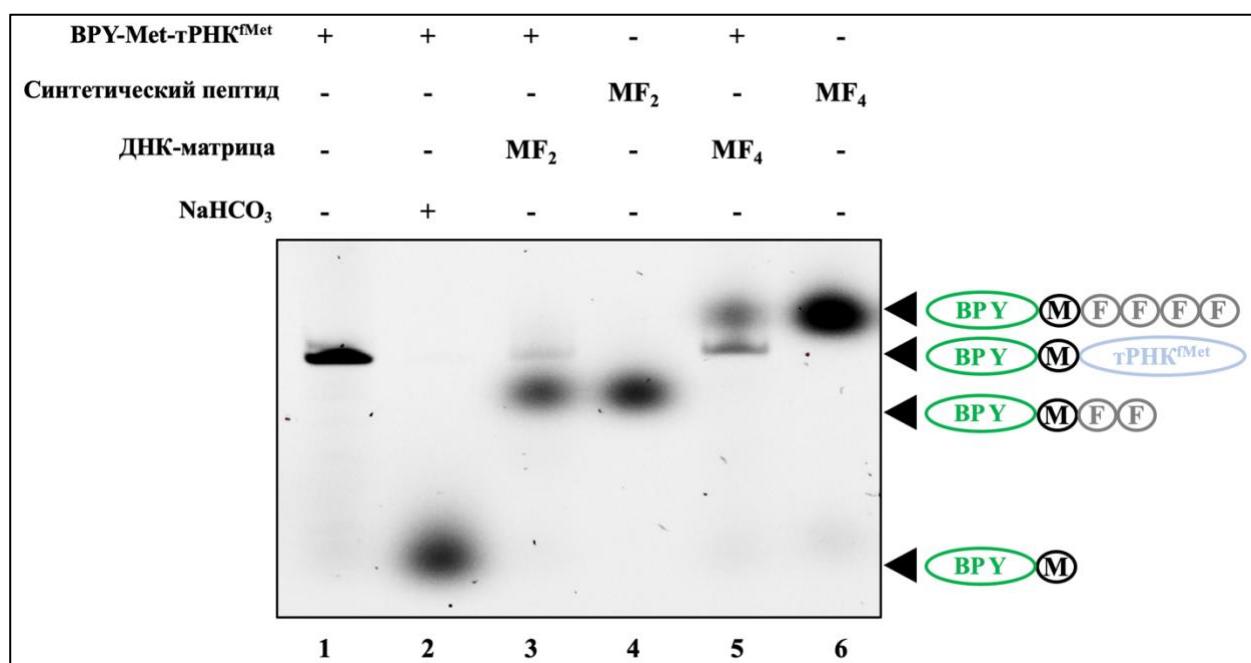


Рис. 33 Разделение и сравнение электрофоретической подвижности коротких BODIPY-меченных пептидов, полученных в результате *in vitro* сопряженной транскрипции-трансляции (использован PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB)) с ДНК-матрицы (дорожки 3 (MF2) и 5 (MF4)), или химически синтезированных (дорожки 4 (MF2) и 6 (MF4)). Продукты реакции обозначены черными стрелками. BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина; серыми кружками — остатки фенилаланина; синим овалом — tRNK^{fMet}. Дорожки 1 и 2 соответствуют BPY-Met-tRNK^{fMet} и BPY-Met после гидролиза сложноэфирной связи, соответственно.

По данным рис. 33 было выявлено, что электрофоретическая подвижность данных пептидов совпадает.

Кроме того, необходимо было подтвердить, что детектируемые продукты реакции не являются артефактами системы для сопряженной транскрипции-трансляции. Для этого в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги была воссоздана система из отдельных очищенных компонентов (для инициации и элонгации трансляции) [75], в которую добавляли мРНК, кодирующую MF и MF6 короткие пептиды (рис. 34).

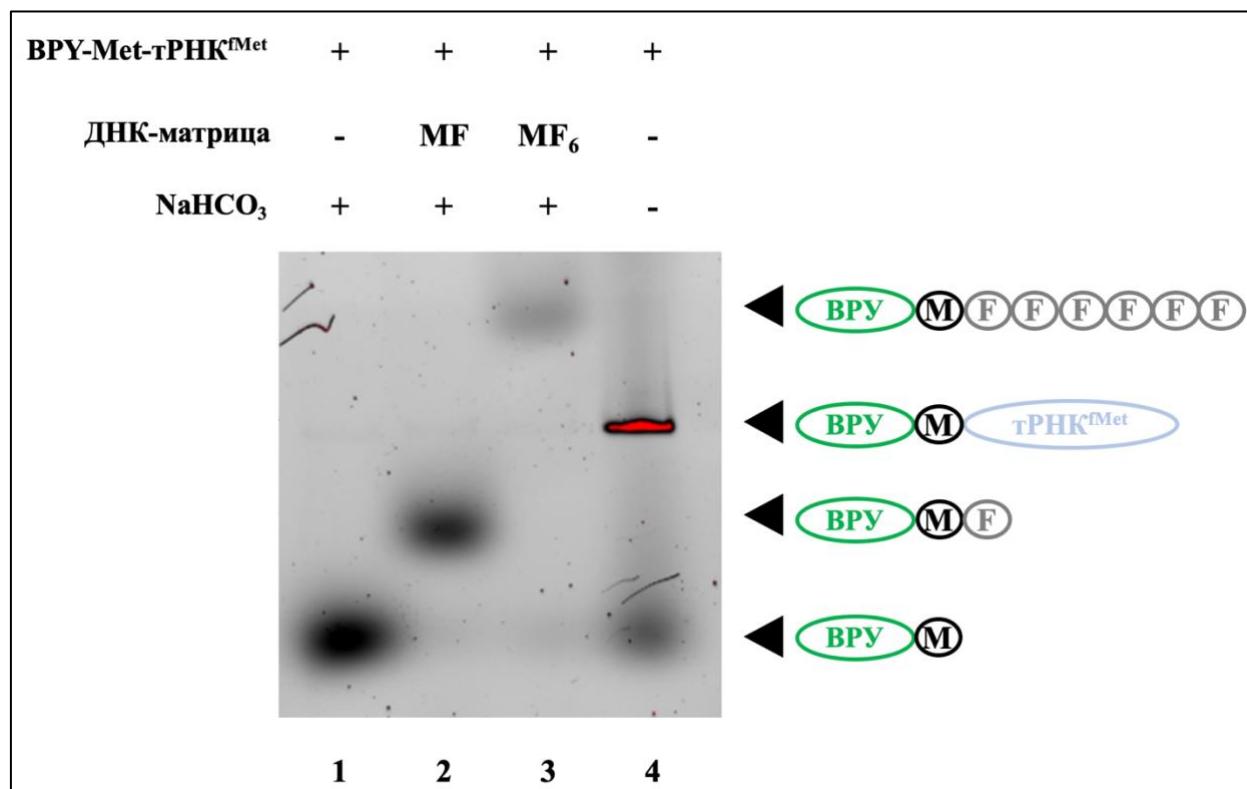


Рис. 34 Электрофоретическое разделение пептидов MF (дорожка 2) и MF6 (дорожка 3), полученных в *in vitro* системе трансляции из очищенных компонентов с использованием предварительно синтезированной мРНК. Продукты реакции обозначены черными стрелками. BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина; серыми кружками — остатки фенилаланина; синим овалом — тРНК^{fMet}. Дорожки 1 и 4 соответствуют BPY-Met после гидролиза сложноэфирной связи и BPY-Met-тРНК^{fMet}, соответственно. (Выполнено в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги).

Наблюдаемые в геле продукты реакции, полученные в *in vitro* системе трансляции из очищенных компонентов, соответствуют синтезированным в сопряженной транскрипционно-трансляционной BODIPY системе меченым пептидам.

Поскольку синтез сульфосукцинимидного эфира BPY сложен и требует дорогостоящего оборудования, в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги был проверен коммерчески доступный сульфосукцинимидный эфир BPY (Thermo Fisher Scientific, кат. D6140) для модификации Met-tРНК^{fMet} в трансляции мРНК, кодирующей МФ (рис. 35).

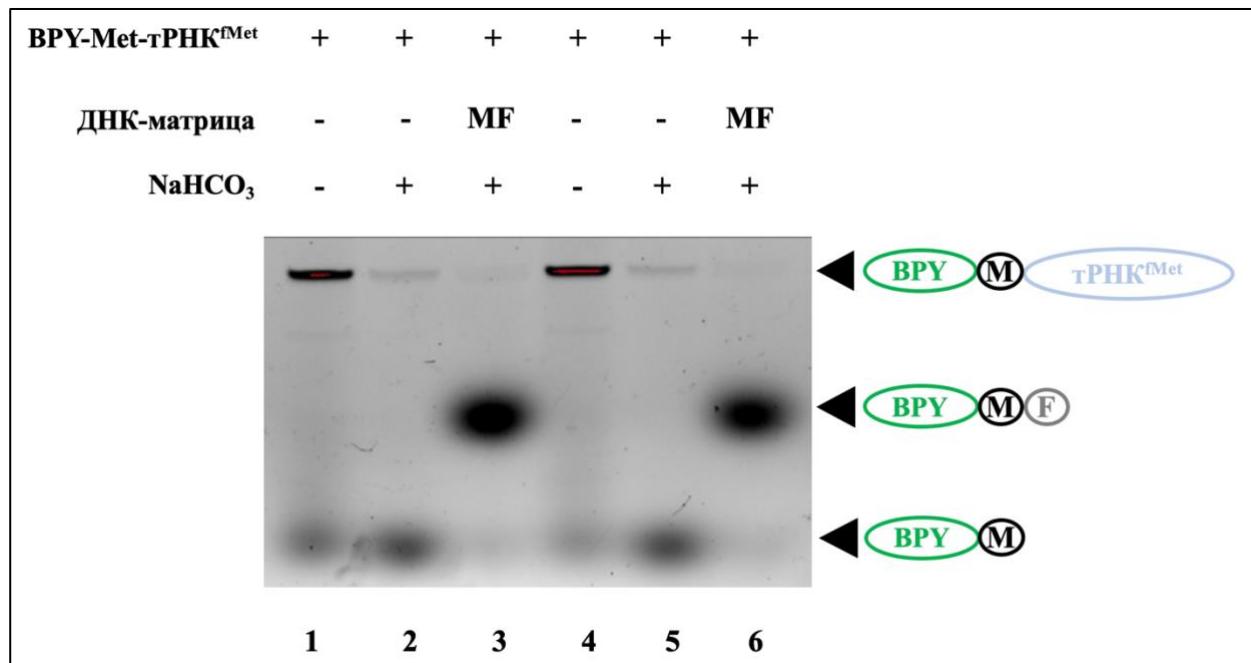


Рис. 35 Сравнение эффективностей BPY-Met-tPHK^{fMet}, полученных с использованием синтезированного в лабораторных условиях сульфосукцинимидного эфира BPY (дорожки 1–3) и коммерческого сульфосукцинимидного эфира BPY (дорожки 4–6), в *in vitro* системе трансляции из очищенных компонентов с добавлением MF-кодирующей мРНК. BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина; серыми кружками — остатки фенилаланина; синим овалом — tPHK^{fMet}. Исходной BPY-Met-tPHK^{fMet} соответствуют дорожки 1 и 4, BPY-Met после гидролиза сложноэфирной связи — дорожки 2 и 5.

Было выявлено, что и синтезированный в лаборатории, и коммерчески доступный сульфосукцинимидный эфир BPY, необходимые для получения BPY-Met-tPHK^{fMet}, в равной степени подходят для синтеза и детекции коротких пептидов.

1.5 В BODIPY системе возможно визуализировать короткие пептиды, содержащие отличные от фенилаланина аминокислоты

Изначально выбор матриц, содержащих фенилаланин, был обусловлен существованием полиуридин-зависимой системы синтеза полифенилаланина [136] - модели для изучения трансляции *in vitro*, что успешно было продемонстрировано в описанных выше результатах. Однако, существовала необходимость сделать BODIPY-систему трансляции максимально доступной, простой и разнообразной, поэтому было принято решение расширить панель ДНК-матриц (раздел «Материалы и методы»), чтобы проанализировать возможность детекции пептидов, содержащих различные аминокислоты (рис. 36 А и Б): MV (матрица, кодирующая метионин и валина), MV2 (кодирует метионин и два валина), ML2 (кодирует два лейцина), MV2K (кодирует 2 валина и один лизин), MV7 (кодирует метионин и семь валинов).

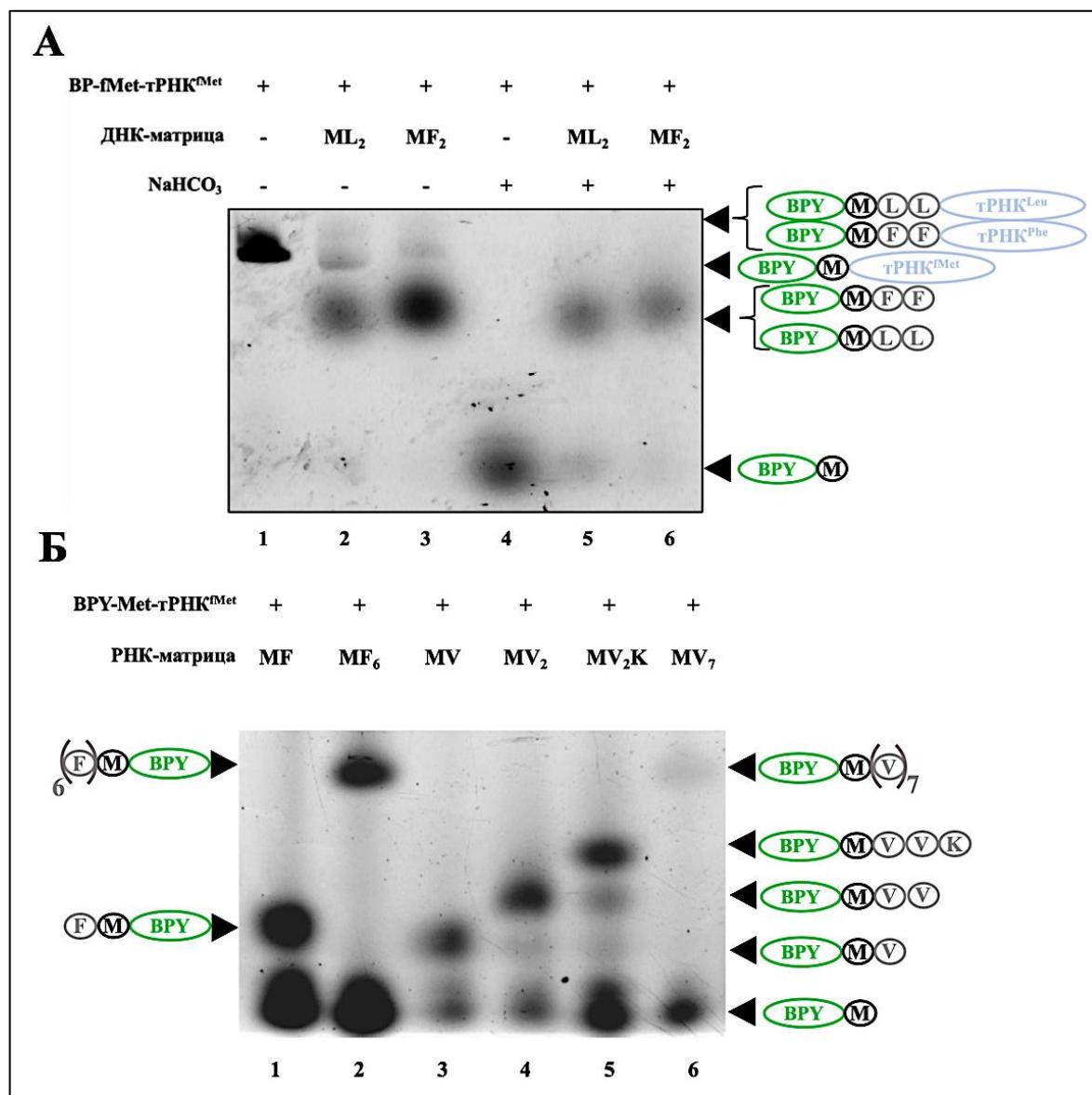


Рис. 36 Сравнение электрофоретических подвижностей BODIPY-меченных пептидов, содержащих отличные от фенилаланина аминокислоты. (А) Сравнение BPY-ML2 (до гидролиза (2) и после гидролиза сложноэфирной связи (5) дорожки 1M NaHCO₃) с BPY-MF2 (до гидролиза (3) и после гидролиза сложноэфирной связи (6) дорожки 1M NaHCO₃). Продукты сопряженной транскрипции-трансляции обозначены черными стрелками. Дорожки 1 и 4 соответствуют исходной BPY-Met-tPHK^{fMet} и BPY-Met, соответственно. (Б) (В сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги) Сравнение подвижности пептидов BPY-MF и BPY-MF6 с BPY-MV, BPY-MV2, BPY-MV2K и BPY-MV7. BPY, обозначенный зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серыми кружками — остатки фенилаланина (F), лейцина (L), валина (V) или лизина (K); синим овалом — tPHK^{fMet} или tPHK^{Phe} или tPHK^{Leu}.

Фенилаланин — незаряженная аминокислота, поэтому подвижность пептидов в геле, содержащих данную аминокислоту, была обусловлена именно подвижностью BODIPY метки (аналогично, для лейцина (рис. 36, А) и валина (рис. 36, Б)). Примечательно, что введение заряженной аминокислоты (лизина) не привело к отклонению подвижности, что также указывает на широкую применимость и доступность разработанной системы.

В сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги было показано, что на подвижность пептидов в геле относительно исходной BPY-Met-tPHK^{fMet} непосредственно влияет плотность РНК ПААГ (рис. 37). Плотность геля в большей степени влияет на подвижность BPY-Met-tPHK^{fMet}, по сравнению с флуоресцентно-меченными пептидами. Процентность РНК ПААГ является важным параметром в разработанной системе, поскольку значение сигнала флуоресценции от исходной BPY-Met-tPHK^{fMet} часто превышает сигнал от тестовых пептидов, что в свою очередь затрудняет визуализацию и анализ полученных результатов. Увеличение процентной концентрации акриламида до 16% позволяет отделить исходную BPY-Met-tPHK^{fMet} от остальных продуктов синтеза.

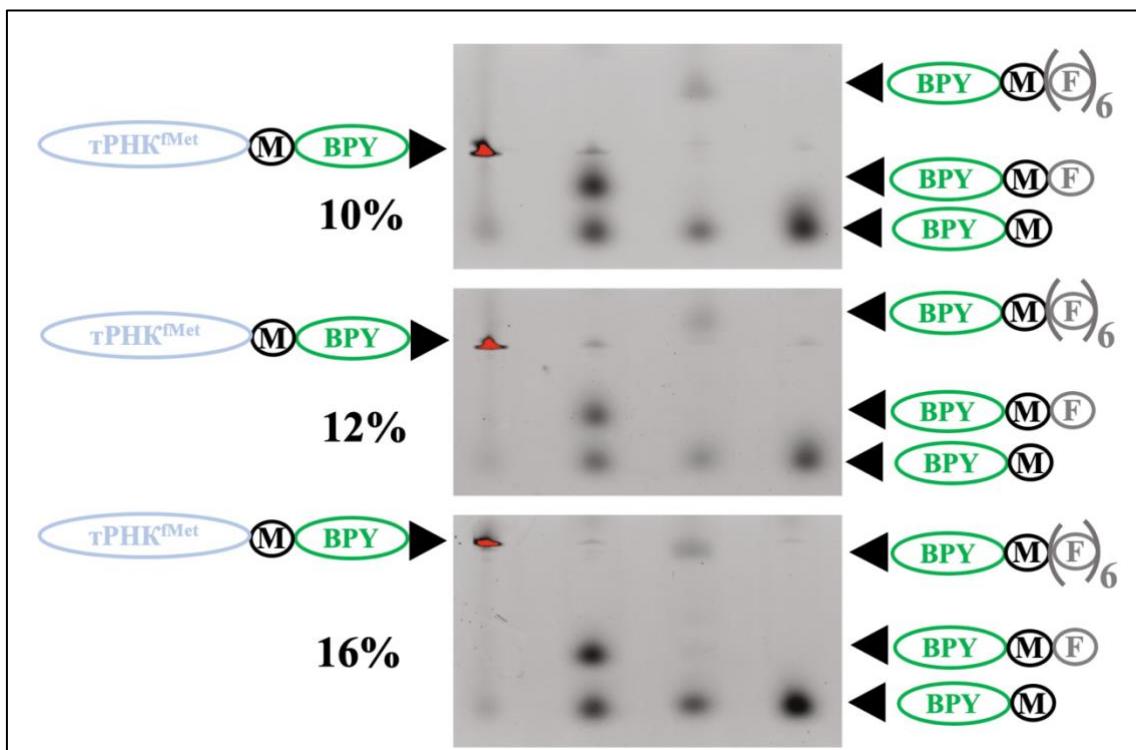


Рис. 37 Электрофоретическая подвижность BPY-Met-tPHK^{fMet} и BODIPY-меченных пептидов, синтезированных с использованием мРНК MF6 и MF, в РНК ПААГ различной плотности (10, 12 и 16%). BPY, обозначенный зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серыми кружками — остатки фенилаланина (F), синим овалом — tPHK^{fMet}. (В сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги).

1.6 Возможность изучения терминационных событий с использованием BODIPY системы

Используя ДНК-матрицу, кодирующую MF пептид (или MF6 – «Приложение 2, рис. 69») с различными стоп-кодонами (MF-UAA, MF-UAG, MF-UGA), коммерческий набор PURExpress Δ RF123 Kit (NEB) без факторов терминации (RFs) для сопряженной транскрипции-трансляции и различные комбинации факторов терминации (RF1 + FR3 или RF2 + RF3), визуализировали возможность образования полноразмерного продукта синтеза на геле (рис. 38).

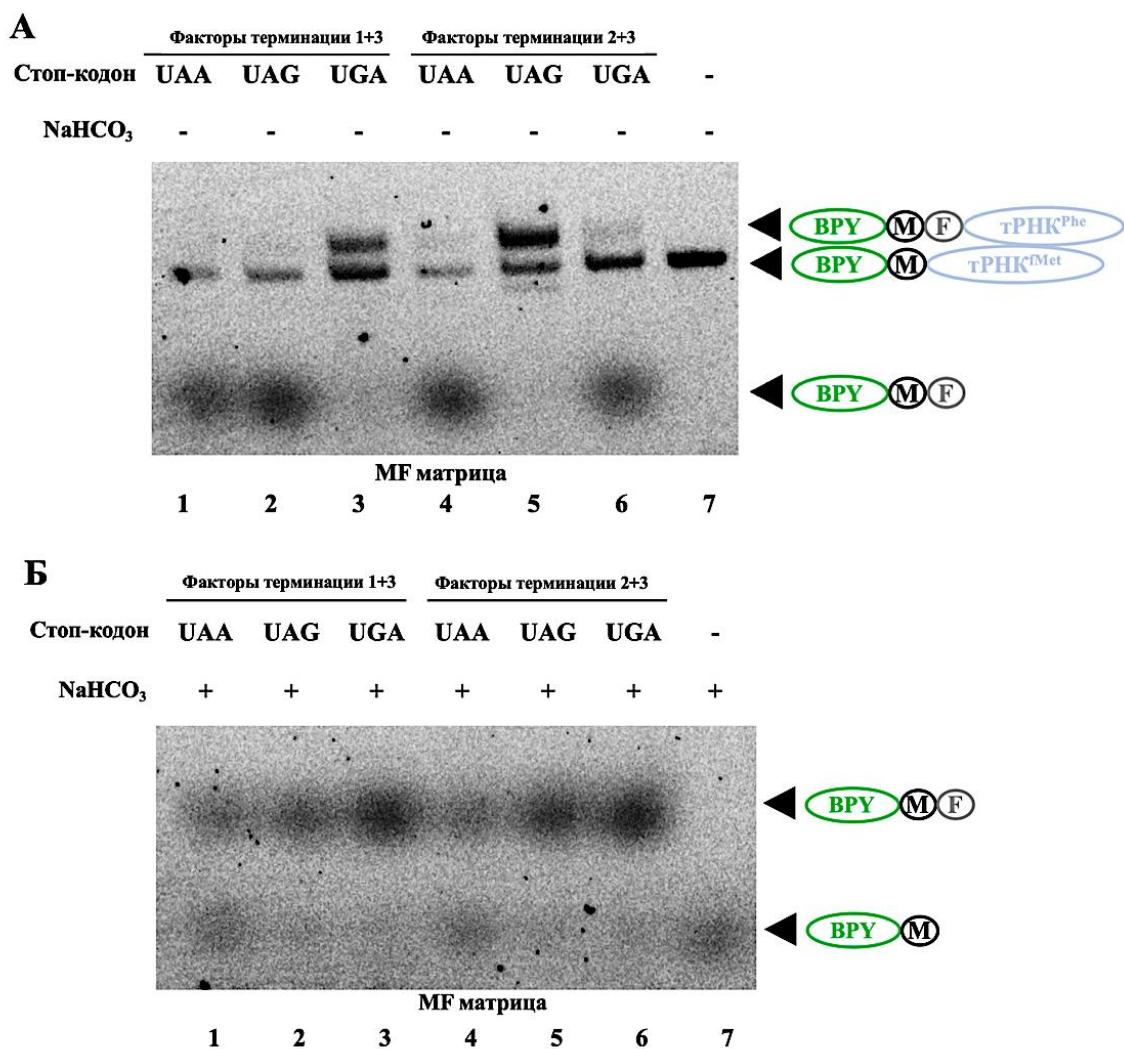


Рис. 38 Оценка эффективности терминации трансляции с помощью электрофореза в РНК ПААГ. ДНК-матрицы, кодирующие MF-пептиды с различными стоп-кодонами (дорожки 1, 4 — UAA; 2, 5 — UAG; 3, 6 — UGA) были добавлены в транскрипционно-трансляционную систему PURExpress ΔRF123 Kit в присутствии BPY-Met-tRNA^{fMet} с добавлением (RF) либо (RF1 и RF3) (1–3 дорожки), либо (RF2 и RF3) (4–6 дорожки). Исходной BPY-Met-tRNA^{fMet} соответствует дорожка 7. (А) Разделение продуктов трансляции без гидролиза сложноэфирной связи 1 М NaHCO₃. (Б) Разделение продуктов трансляции после гидролиза 1 М NaHCO₃. BPY отмечен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — tRNA^{fMet} или tRNA^{Phe}.

Как было показано ранее, комбинация факторов терминации RF2 + RF3 менее эффективна, чем RF1 + RF3 [137]. Гидролиз пептидил-тРНК, вызванный факторами терминации трансляции, сопоставим с гидролизом, вызванным действием 1 М NaHCO₃ (рис. 38, Б, 7 дорожка). Исходя из данных эксперимента, можно сделать вывод, что BODIPY-система подходит для мониторинга высвобождения трансляционных продуктов.

1.7 Использование разделения BODIPY-меченных пептидов для изучения ингибиторов трансляции

Наиболее значимым приложением данного метода является возможность выявить механизм действия ингибиторов, способных блокировать этапы инициации трансляции, пептидилтрансферазной реакции, транслокации или терминации трансляции. Важно, что BODIPY-система позволяет определять механизм действия, как известных антибиотиков, так и потенциально новых (подробнее об этом в разделе «Результаты и обсуждение», часть 2 и 3). На данной системе была протестирована панель известных антибиотиков, представленных на рис. 39 (А, Б):

А) ингибиторы транслокации, такие как тиострептон – олигопептидный антибиотик, вызывающий ингибирование реакций связывания EF-Tu и EF-G факторов в комплексе с GTP в области 50S субъединицы рибосом [138]; эритромицин и тилозин [139], [140] – макролидные антибиотики, которые связываются в области рибосомного туннеля, закупоривая его, или же подобный по механизму действия антибиотик – этамицин, относящийся к классу стрептограминов Б [43].

Б) Ингибиторы пептидил-трансферазной реакции – ретапамулин и мадумицин: мадумицин II – антибиотик стрептограмин А класса, ингибирует образование первой пептидной связи за счет нарушения правильного расположения ССА-концов в ПТЦ [5]. Ретапамулин – производное трициклического природного дитерпена; блокирует образование пептида, препятствуя связыванию субстрата [141].

В) Ингибитор элонгации и терминации трансляции – бластицидин С – предотвращает высвобождение пептида, опосредованное RF1. Бластицидин С связывается с 50S субъединицей рибосомы вблизи Р-сайта и изменяет структуру тРНК, которая в свою очередь, мешает связыванию аминоацил-тРНК в А-сайте, блокируя элонгацию трансляции [142].

Г) Пуромицин – ингибитор элонгации гликозидного ряда, по своей структуре напоминает 3'-конец аминоацилированной тРНК (аа-тРНК) с модифицированным основанием аденоцина, ковалентно связанным с аминокислотой тирозином. Благодаря своей уникальной структуре, пуромицин может проникать в А-сайт рибосомы, принимая на себя растущую полипептидную цепь из Р-сайта,aborting продолжение трансляции [143], [144].

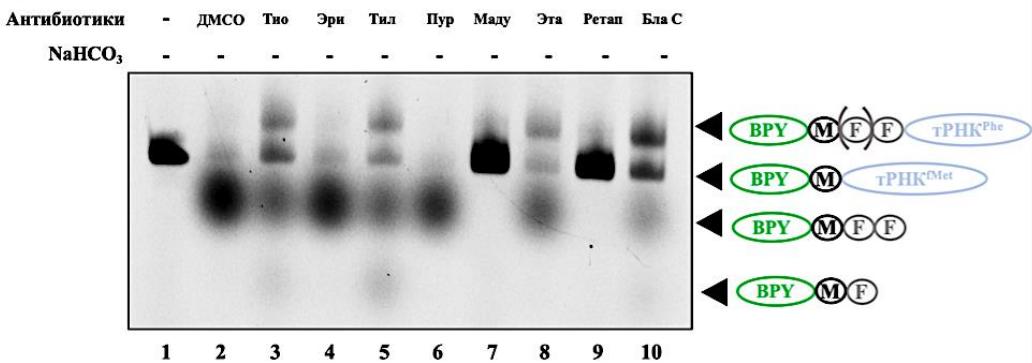
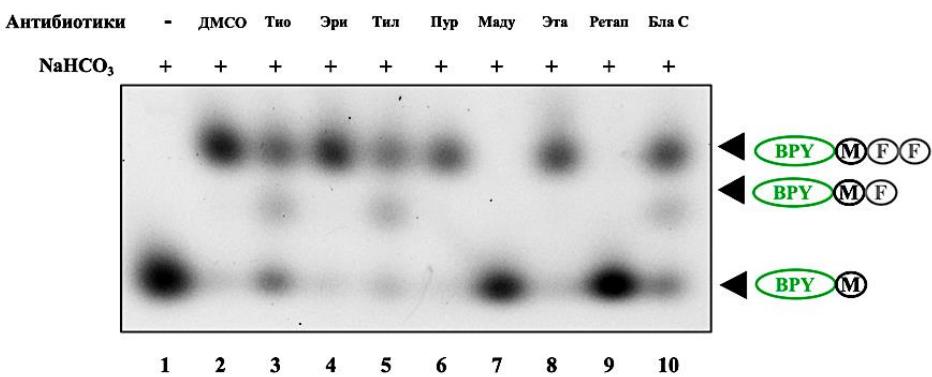
А**Б**

Рис. 39 Изучение механизма действия антибиотиков с помощью BODIPY-системы. Продукты *in vitro* трансляции мРНК (с ДНК-матрицы), кодирующей MF2, в присутствии исходной BPY-Met-tPHK^{Met} и антибиотиков обозначены черными стрелками (использован PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB)). (А) Разделение продуктов трансляции до гидролиза сложноэфирной связи. (Б) Разделение продуктов трансляции после гидролиза 1 М NaHCO₃. Дорожка 1 соответствует исходной BPY-Met-tPHK^{Met}. Отрицательный контроль – 1% ДМСО без антибиотика представлен на дорожке 2. Антибиотики: тиострептон (Тио), эритромицин (Эри), тилозин (Тил), пуромицин (Пур), мадумицин (Маду), этамицин А (Эта), ретапамулин (Ретап) и бластицидин С (Бла С) представлены на дорожках 3-10, соответственно. BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — тPHK^{Met} или тPHK^{Phe}.

Как и следовало ожидать в случае с контрольной реакцией 1 % ДМСО (дорожка 2) – в основном, образуется полноразмерный продукт MF2.

В случае с эритромицином (дорожка 4) – также образуется полноразмерный продукт MF2 (поскольку для остановки трансляции важную роль играет специфичный мотив RLR на мРНК, который распознается антибиотиком, а в случае MF2 матрицы такого мотива нет) [145].

Для тиострептона (дорожка 3), тилозина (дорожка 5) и бластицидина С (дорожка 10) заметны продукты MF/MF2 связанные с тPHK^{Phe}, которые после гидролиза эфирной связи дают отчетливо заметный промежуточный продукт MF, что указывает на ингибирования процесса элонгации данными антибиотиками, а с случае с бластицидина С еще и на ингибирование терминации трансляции, так как количество MF2 продукта после гидролиза заметно увеличивается.

Интересно, что этамицин А (дорожка 8) блокировал трансляцию на стадии после образования BPY-MF2-тРНК^{Phe}, но до гидролиза пептидил-тРНК, хотя по механизму своего действия (связывается в начале рибосомного туннеля) должен был вести себя подобно эритромицину или тилозину.

В случае с ретапамулином (дорожка 9) и мадумицином (дорожка 7) трансляция полностью подавляется, не происходит образования промежуточных продуктов, поскольку данные антибиотики блокируют образование первой пептидной связи.

В данном эксперименте, на первый взгляд, пуромицин (дорожка 6) не оказывает видимого эффекта на трансляцию, однако можно заметить, что количество полноразмерного продукта, по сравнению с отрицательным контролем – 1% ДМСО, заметно меньше. Это наталкивает на мысль о том, что пуромицин переносит на себя BODIPY-меченный пептид, и вероятно, либо не входит в гель, либо обладает иной подвижностью в геле (см. «Приложение 2, рис. 70»).

Так или иначе, представленная BODIPY-система трансляции может быть эффективно использована для классификации механизмов действия различных антибиотиков.

Подводя итоги, необходимо подчеркнуть, что разработанный метод является простым, удобным и доступным для большинства лабораторий. Данная система имеет важное приложение: с ее помощью можно оценивать влияние различных ингибиторов на каждый этап биосинтеза белка по отдельности.

Часть 2. Цистоцин и пуромицин

2.0 Введение

Пуромицин - известный аминонуклеозидный антибиотик, подавляющий биосинтез белка. Был впервые выделен из *Streptomyces alboniger* [146]. Благодаря своей структуре пуромицин попадает в А-сайт рибосомы, имитируя 3'-конец аминоацетилированной тРНК, на которую происходит перенос растущей пептидной цепи, приводящий к преждевременному абортированию трансляции [147] (рис. 40).

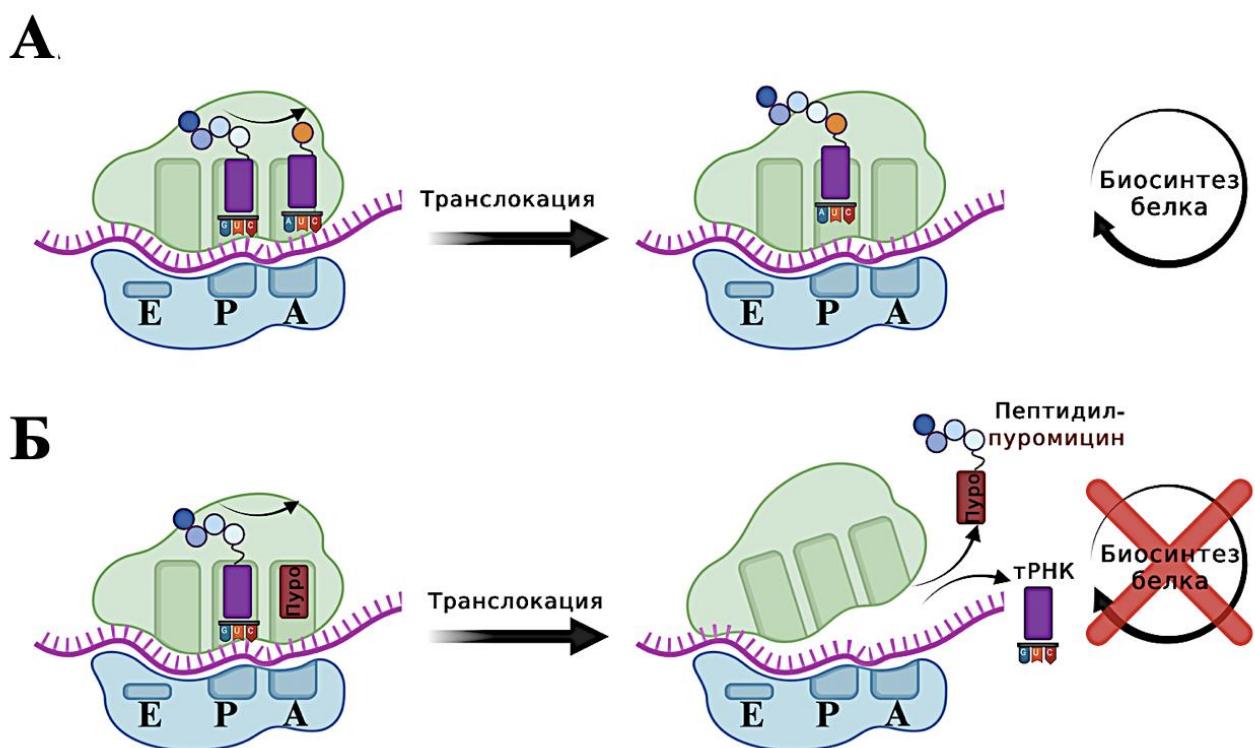


Рис. 40 Механизм элонгации трансляции в отсутствие (А) и присутствии пуромицина (Б). Без пуромицина пептидилтрансферазная реакция и транслокация (реакции элонгации) последовательно сменяют друг друга до тех пор, пока в А-сайте рибосомы не окажется стоп-кодон. В случае добавления пуромицина в систему происходит прекращение трансляции за счет высвобождения растущего пептида, перенесенного на пуромицин (пептидил-пуромицин) (Рисунок адаптирован из [148]). Фиолетовым прямоугольником обозначена тРНК, красным прямоугольником – молекула пуромицина; кружочками – аминокислоты.

В начале 2000-х годов был открыт антибиотик нуклеозидного класса – цистоцин, выделенный из *Streptomyces* sp. GCA0001 [8]. Его структура была определена с помощью ЯМР: оказалось, что цистоцин похож на пуромицин, с разницей в замене концевого метилтирофилена на метилцистеин (рис. 41, синий цвет).

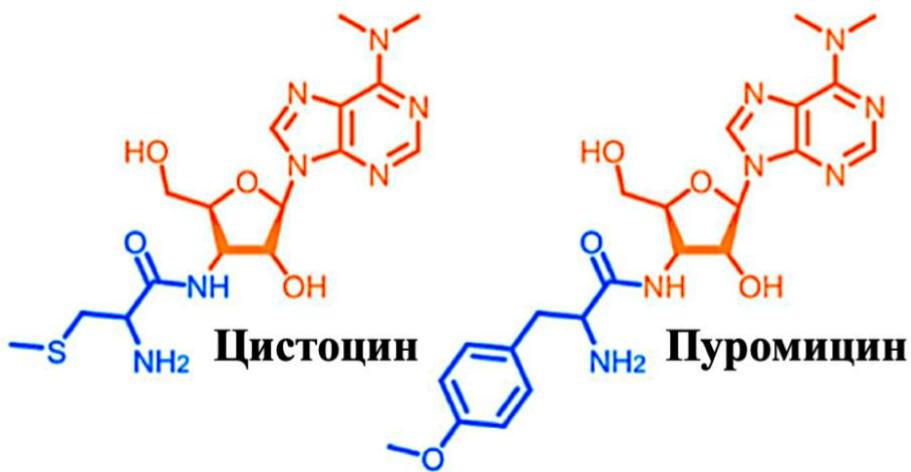


Рис. 41 Структура цистоцина и пуромицина. Оранжевым цветом обозначена общая структурная часть (нуклеозидный сегмент (3'-амино-3'-дезокси-N,N-диметиладенозин), с которым через 3'-аминогруппу рибозного кольца ковалентно связан аминокислотный сегмент (4-метоксифенилаланин), синим цветом – остаток метилтироцина (в случае пуромицина) или метилцистеина (в случае цистоцина).

Механизм действия цистоцина не был изучен. Единственная статья, в которой обсуждаются выделение цистоцина, его антибактериальные и противораковые свойства, относится к 2003 году [8]: была измерена МИК (минимальная ингибирующая концентрация) на 20 различных бактериальных штаммах (как грамположительных, так и грамотрицательных), а также противоопухолевая активность на клеточных линиях: A549 (немелкоклеточный рак лёгкого человека), SK-OV-3 (яичник человека), SK-MEL-2 (меланома человека), XF-498 (центральная нервная система человека) и НСТ-15 (толстая кишка человека) (Приложение 2, таблицы 12-13). Необходимо отметить, что МИК цистоцина практически всегда был в 2-4 раза ниже, чем у пуромицина. И цистоцин проявлял активность в большей степени по отношению к грамположительным бактериям, чем к грамотрицательным (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* и *Enterobacter cloacae*).

Поскольку цистоцин структурно похож на пуромицин (отличие только в аминокислотном фрагменте), а активность его, как было показано, ниже, то возможная дальнейшая модификации аминокислотного фрагмента будет способствовать усилинию антибактериальной и противоопухолевой активностей.

Удаление пуринового основания приводит к потере активности пуромицина, в то время как тирозиновую часть можно заменить триптофаном без заметной потери активности, (замена на другие естественные L-аминокислоты, может привести к заметному снижению ингибирующего действия пуромицина (более того, замена на глицин или пролин полностью предотвращает пуромицилирование) [148], [149].

2.1 Культивация штамма, выделение и очистка цистоцина

В лаборатории О. А. Донцовой группы, под руководством Д. А. Лукьянова, занимается поиском новых антибактериальных препаратов, тестируя химически синтезированные вещества (ChemRar) или различные бактериальные культуральные жидкости (в частности, в сотрудничестве с Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), которая предоставила штамм *Streptomyces sp. Ac-502*).

Для производства антибиотика, штамм *Streptomyces sp. Ac-502* культивировали в среде LB на 28°C в течение 4 дней со скоростью 150 об/мин, затем клетки пересевали и культивировали еще 6 дней в аналогичных условиях. После проверки культуральной жидкости на антибактериальную активность, активный компонент был выделен и очищен с помощью ВЭЖХ. Последующие масс-спектрометрический и ЯМР анализы, проведенные в сотрудничестве с научной группой В. А. Алферовой, подтвердили что выделенное соединение является известным антибиотиком – цистоцином (приложение 2, рис. 71-72).

2.2 Анализ механизма действия цистоцина с использованием двойной репортерной системы DualRep2

После очистки и выделения цистоцина, было проведено сравнение первичного механизма действия данного антибиотика с пуромицином с использованием двойной репортерной системы, разработанной д.х.н. Остреманом И. А. [43]. Кратко: штамм *E. coli* JW5503, трансформированный плазмидой pDualRep2 высеваются на чашки Петри с агаром, на поверхность которого наносят тестируемые антибиотики (в концентрации 20 мг/мл) с двумя контролями – 5 мг/мл эритромицина (ингибитор трансляции) и 10 мкг/мл ципрофлоксацина (ингибитор ДНК-гиразы). Если тестируемое вещество вызывает SOS-ответ клетки, то экспрессия гена turboRFP, стоящего под промотором генов SOS-ответа, детектируется в канале Cy3 (605 нм). В случае, если антибиотик нарушает биосинтез белка, вызывая остановку рибосом на мРНК, то накапливается флуоресцентный белок Katushka2S, детектируемый в канале Cy5 (647 нм). Сканирование флуоресценции происходит с помощью ChemiDoc® BIORAD. Полученные черно-белые изображения накладываются друг на друга с присвоением им цвета: зеленого для индукции SOS-ответа (сигнал от RFP белка), и красного – нарушение трансляции (сигнал от белка Katushka2S) (приложение 2, рис. 73).

Таким образом, двойная репортерная система позволяет одновременного детектировать с одной чашки Петри соединения, индуцирующие SOS-ответ клетки или нарушающие биосинтез белка (рис. 42).

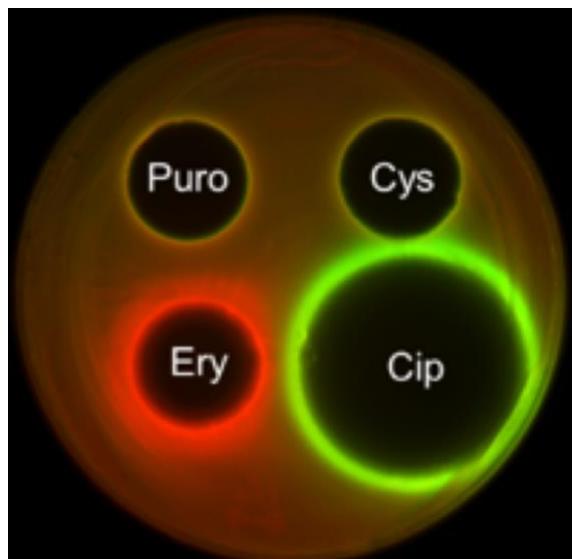


Рис. 42 Сравнение механизма действия пуромицина и цистоцина с использованием двойной репортерной системы DualRep2. Показаны Puro (20 мг/мл) – пуромицин; и Cys (20 мг/мл) – цистоцин, а также контрольные антибиотики Ery – эритромицин (5 мг/мл) и Cip – ципрофлоксацин (10 мкг/мл).

Важно отметить, что тестирование механизма действия пуромицина и цистоцина с использованием двойной репортерной системы DualRep2 происходило на чувствительном штамме *E. coli* ΔtolC (в котором отсутствует TolC - важная часть эффлюксной системы AcrAB-TolC, отвечающая за экспорт антибактериальных веществ из клеток) [150].

Как видно из рис. 42 оба антибиотика (цистоцин и пуромицин) вызывают нарушение биосинтеза белка, поскольку можно наблюдать флуоресценцию от белка Katushka2S (красно-оранжевое гало на границе зоны ингибирования).

2.3 Сравнение МИК (минимальной ингибирующей концентрации) для пуромицина и цистоцина на различных бактериальных штаммах

Одной из базовых оценок эффективности антибактериальных свойств веществ является определение минимальной ингибирующей концентрации на различных бактериальных штаммах. Используя метод разведения в 2 раза, была определена минимальная концентрация антибиотика (МИК), при которой происходило полное подавление роста бактериальных культур (таблица 6).

Штамм	МИК, мкг/мл	
	Цистоцин	Пуромицин
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	3.12	1.56
<i>Escherichia coli</i> <i>lptD^{mut}</i>	50	6.25
<i>Escherichia coli</i> <i>ΔtolC</i>	3.12	3.12
<i>Arthrobacter</i> ATCC 21022	50	6.25
<i>Bacillus cereus</i> X1	>50	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> GFP	>50	25
<i>Bacillus subtilis</i> 168	>50	>50
<i>Lactococcus lactis</i> 61	>50	25
<i>Enterococcus faecium</i> 40	>50	12.5
<i>Enterococcus faecalis</i> 125	>50	12.5
<i>Macroccoccus caseolyticus</i> 107	25	6.25
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	>50	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 39	>50	12.5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 515	>50	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 51911	>50	>50
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25	25
<i>Streptococcus anginosus</i> 213	12.5	3.125
<i>Streptococcus agalactiae</i> 3	25	3.125
<i>Streptococcus parasanguinis</i> 60	25	6.25
<i>Streptococcus salivarius</i> 497	25	6.25

Таблица. 6 Сравнение МИК для пуромицина и цистоцина в отношении грамположительных и грамотрицательных бактериальных штаммов. Чем выше значения МИК, тем ниже активность антибиотика против данного штамма. Большая часть штаммов была любезно предоставлена ООО «Литек» (Москва, Россия) (подробнее см. «Материалы и методы»). (Выполнено в сотрудничестве с научной группой Алферовой В. А.)

Исходя из полученных данных, активность цистоцина значительно ниже (в 2-8 раз), чем пуромицина. Наибольшую активность цистоцин проявляет против *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *E. coli* *ΔtolC* и *Streptococcus anginosus* 213.

Примечательно, что штамм *E. coli* *ΔtolC* (в котором отсутствует белок внешней мембраны) более чувствителен к цистоцину, чем *E. coli* *lptD^{mut}* (штамм, с частичной делецией (330–352 кодоны) гена *lptD*, кодирующего белок, что участвует в сборке липополисахаридов на внешней мембране [129]. Вероятно, такая разница (более, чем в 10 раз) обусловлена невозможностью экспорта антибиотика из клеток штамма *E. coli* *ΔtolC*, в то время как в *E. coli* *lptD^{mut}* проблем с выводом антибиотика не наблюдается.

Значения МИК для выбранных бактериальных штаммов помогают расширить панель исходных данных по МИК, полученных в 2003 году [8].

Аналогично, совместно с Зотовой Полиной были получены данные по цитотоксичности для цистоцина и пуромицина на клеточных линиях HEK293T и *E. coli* $\Delta tolC$ (рис. 43).

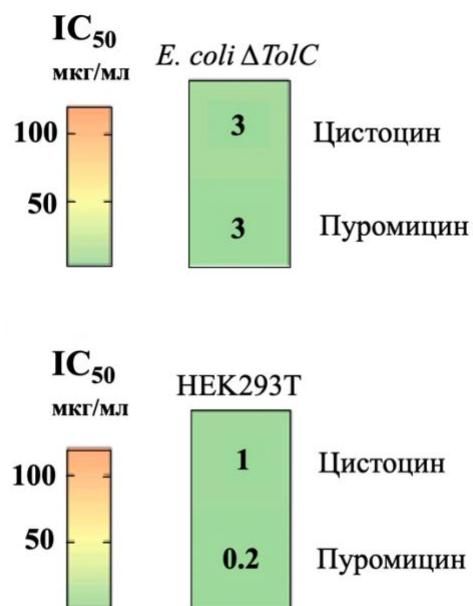


Рис. 43 Значения IC₅₀ для пуромицина и цистоцина на клеточной линии HEK293T, в сравнении с линией *E. coli* $\Delta tolC$.

Как видно, пуромицин является более токсичным для эукариотических клеток, чем цистоцин, при одинаковых значениях IC₅₀ в бактериальной культуре.

2.4 Сравнение влияния пуромицина и цистоцина на прокариотическую и эукариотическую трансляции *in vitro*

Как было показано на рис. 42, в эксперименте с использованием двойной репортерной системы DualRep2, цистоцин и пуромицин оказали одинаковое влияние на бактериальные клетки, вызывая нарушение биосинтеза белка. Структурное сходство данных антибиотиков также указывает на вероятную схожесть механизма их действия. Для того, чтобы сравнить влияние цистоцина и пуромицина на биосинтез белка, была проведена *in vitro* трансляция, как в прокариотической системе из очищенных компонентов «PurExpress» NEB, так и в эукариотической системе с использованием экстрактов клеток HEK293T, предоставленные к.х.н. Комаровой Е. С (Рис. 44).

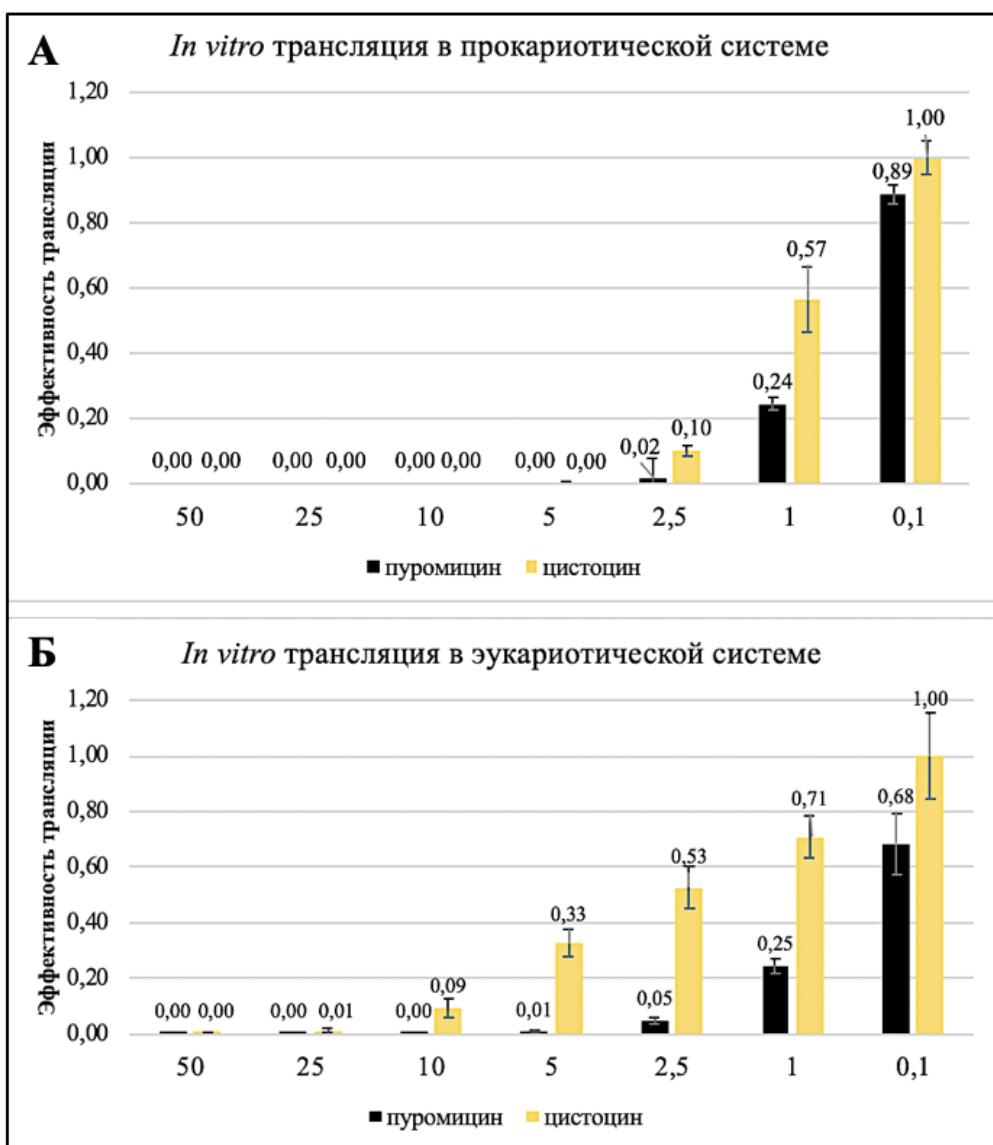


Рис. 44 Сравнение влияния пуромицина и цистоцина на трансляцию в прокариотической (А) и эукариотической (Б) системах *in vitro*. По оси Х отложены конечные концентрации пуромицина и цистоцина в мкМ, а по оси У – эффективность трансляции. Все измерения были выполнены трижды. Все данные были нормированы на контрольные значения без добавления антибиотиков. Полосы погрешностей показывают величину стандартного отклонения.

Интересно отметить, что пуромицин в равной степени ингибирует как прокариотическую, так и эукариотическую трансляцию в концентрации 2.5 мкМ и выше, в отличие от цистоцина, который в эукариотической системе (полное подавление синтеза белка происходит при концентрации 10–25 мкМ) менее активный, чем в прокариотической (подавление при 2.5–5 мкМ).

2.5 Сравнение механизма действия пуромицина и цистоцина с использованием BODIPY-системы

Чтобы подтвердить предположение о том, что цистоцин и пуромицин имеют одинаковый механизм действия, оба антибиотика были протестированы в BODIPY-системе для визуализации

синтезированных флуоресцентно-меченные пептидов с использованием MF2 ДНК-матрицы (рис. 45).

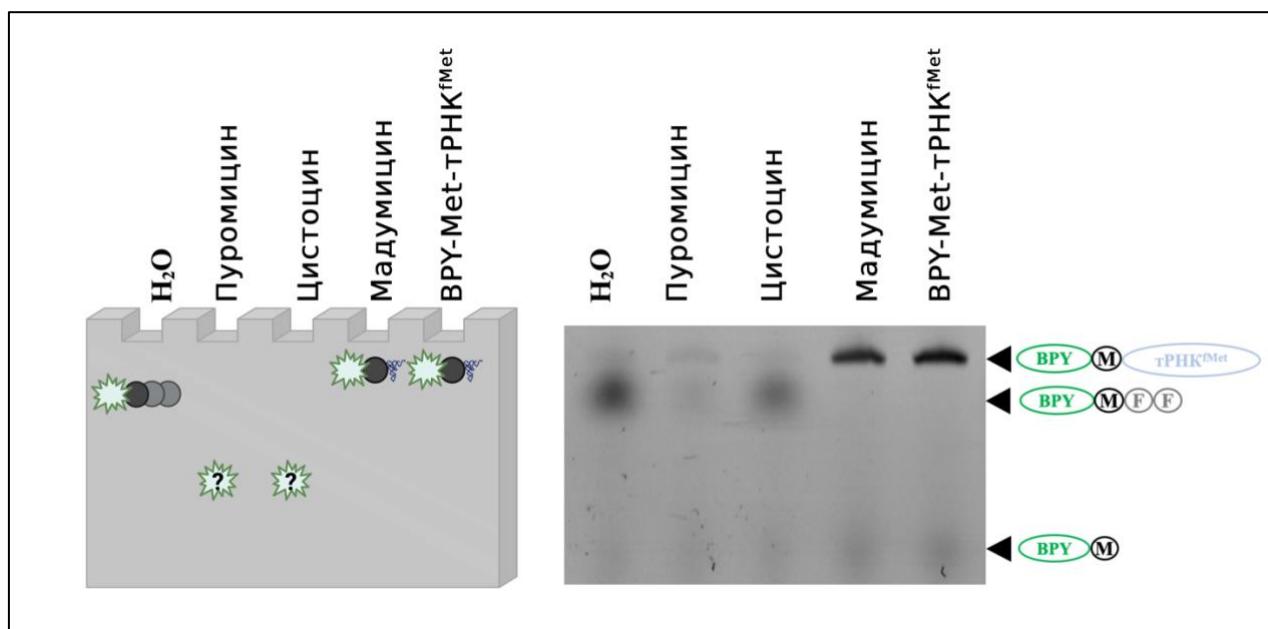


Рис. 45 Сравнение механизма действия пуромицина и цистоцина в BODIPY-системе. Слева – гипотетическая модель, справа – полученные экспериментальные данные (до гидролиза эфирной связи) в *in vitro* системе из очищенных компонентов (PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB)) с использованием MF2 ДНК-матрицы, исходной BPY-Met-tRNK^{fMet} и антибиотиков. Продукты реакции показаны черными стрелками. Антибиотики (в концентрациях 50 мкМ): пуромицин, цистоцин и мадумицин. BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — тRNK^{fMet}. Знаком вопроса в гипотетической модели обозначены продукты синтеза при добавлении пуромицина и/или цистоцина в трансляционную систему.

Поскольку мадумицин – ингибитор пептидилтрансферазной реакции, то и в гипотетически предсказанной модели и в экспериментальных данных, происходит полное ингибирование синтеза белка (на геле видна полоса, соответствующая исходной BPY-Met-tRNK^{fMet}). Как видно, в случае цистоцина и в большей степени пуромицина продукта трансляции (BODIPY-меченный пептид MF2) по сравнению с отрицательным контролем – водой – значительно меньше. При этом исходная BPY-Met-tRNK^{fMet} практически не визуализируется в геле, что указывает на ее расходование в процессе биосинтеза белка. Вероятно, как и было описано в «Результатах и обсуждении, часть 1», продукты реакции переносятся на пуромицин и/или цистоцин и не входят в гель, либо двигаются в гель в обратном направлении (см. Приложение 2, рис. 70).

Образование цистоцин- и пуромицин-укороченных пептидов было подтверждено анализом LC-MS (в сотрудничестве с научной группой Алферовой В. А.) (приложение 2, рис. 72).

2.6 Сравнение механизмов действия пуромицина и цистоцина toe-print анализом

Одним из первых методов по определению механизма действия антибиотиков является toe-print анализ, благодаря которому можно с точностью до кодона выявить точное место остановки рибосом на мРНК. Данный метод является достаточно трудоемким, кроме того, для его реализации необходима радиоактивная изотопная метка (^{32}P), что накладывает ряд ограничений на применение toe-print анализа. Тем не менее, этот метод широко используется в лаборатории О. А. Донцовой.

Сравнение механизмов действия пуромицина (2.5 и 25 мкМ) и цистоцина (5 и 50 мкМ) производилось с использованием ErmBL матрицы в присутствии антибиотика боррелидина (50 мкМ) - ингибитора треониновой тРНК-сингтетазы (рис. 46).

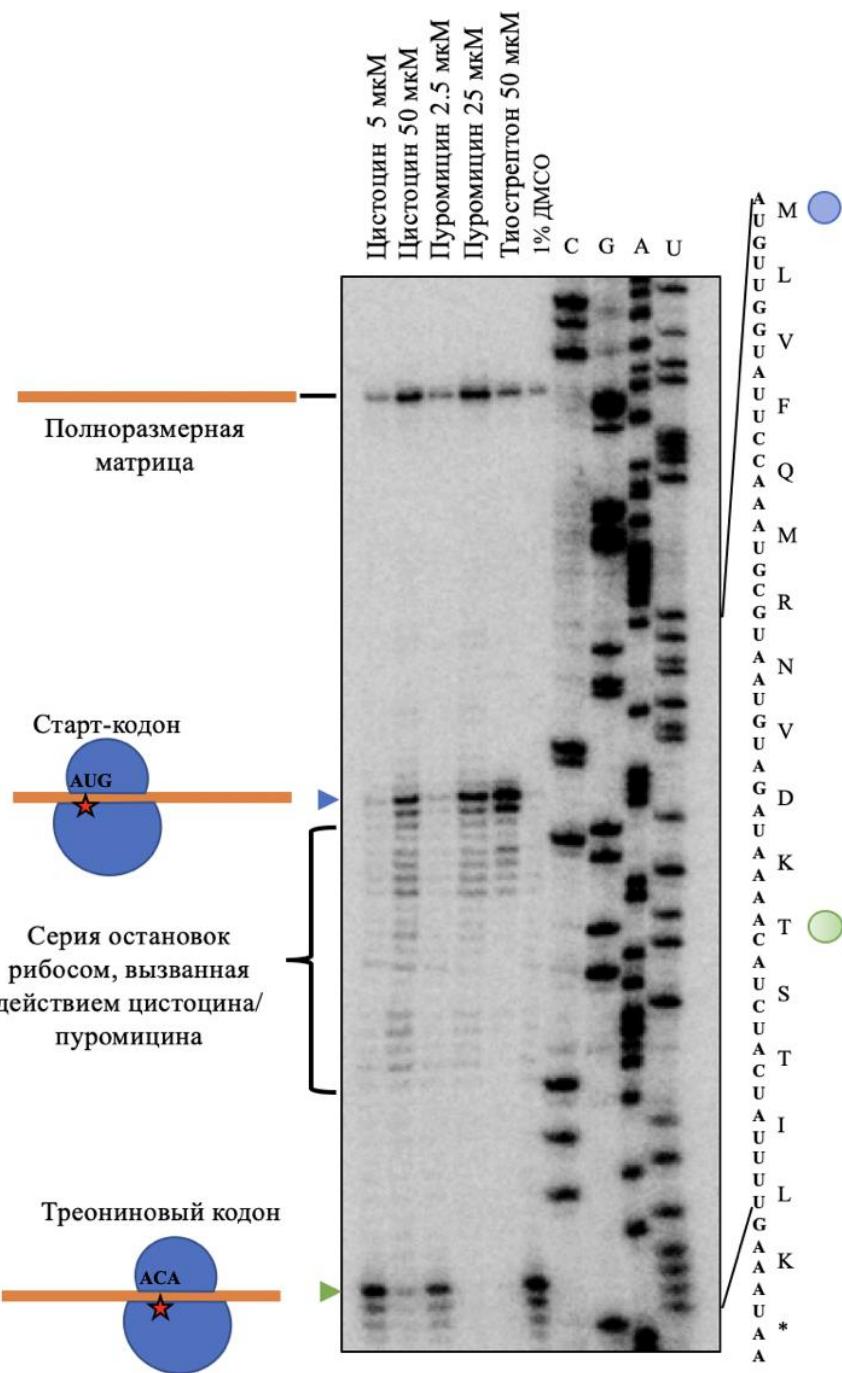


Рис. 46 Toe-print анализ на природной матрице ErmBL. 1 - 4 дорожки соответствуют тестируемым антибиотикам – цистоцину (5 мкМ (1 дорожка) и 50 мкМ (2 дорожка) и пуромицину - 2.5 мкМ (3 дорожка) и 25 мкМ (4 дорожка); 5 дорожка – положительный контроль – тиострептон (50 мкМ) и отрицательный контроль – 1% ДМСО; U, A, C, G – дорожки секвенирования последовательности гена ErmBL. Синим кружком обозначена остановка на стартовом кодоне (P-сайт рибосомы), а зеленым – на треониновом кодоне (P-сайт рибосомы).

В больших концентрациях (50 мкМ) для цистоцина и (25 мкМ) для пуромицина остановка трансляции происходила вблизи старт-кодона (или на нем). При этом в случае пуромицина наблюдалось totalное ингибирование биосинтеза белка и рибосомы не достигали треонинового кодона (12 кодон). В реакции с цистоцином, напротив, трансляция была частично подавлена и

часть рибосом достигала 12 кодона (слабо выраженная полоска в дорожке 2). В более низких концентрациях пуромицин (2,5 мкМ) и цистоцин (5 мкМ) не оказывают значимого влияния на трансляцию.

Подводя итог, необходимо отметить, что, несмотря на сходство в структуре и механизме действия пуромицина и цистоцина, их влияние на эукариотические и прокариотические клетки немного отличается: так, в прокариотической системе, пуромицин (в отличие от цистоцина) подавляет биосинтез белка в более низких концентрациях, однако по данным МТТ для HEK293T, цистоцин в 8 раз менее токсичен по сравнению с пуромицином.

Несмотря на то, что пуромицин более активно ингибирует биосинтез белка, не давая возможности при больших концентрациях (50 мкМ) рибосомам достичь треонинового кодона, в отличие от цистоцина, механизм их действия, вероятно схож: как было показано lc-ms анализом, происходит перенос растущей цепочки полипептида на оба антибиотика (детектировались укороченные пептиды, соединенные с пуромицином или цистоцином). Вероятно, антибиотики обладают одинаковым механизмом действия, т.е. мимикрируют под 3'-концевой фрагмент аа-tРНК и связываются в А-сайте рибосомы, однако данное предположение требует дополнительных экспериментальных подтверждений.

Часть 3. Терморубин

3.0 Введение

В 1964 году из *Thermoactinomyces antibioticus* был выделен ароматический антраценопираноновый антибиотик, имеющий структурное сходство с тетрациклинами (рис. 47), названный терморубином (THR). Данный антибиотик проявлял активность против как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [13]. Также было показано, что терморубин подавлял *in vitro* трансляцию только в прокариотической системе, не воздействуя на трансляцию в эукариотических клетках [151]. Исходя из этих данных было выдвинуто предположение, что основной мишенью действия антибиотика в бактериальной клетки является рибосома.

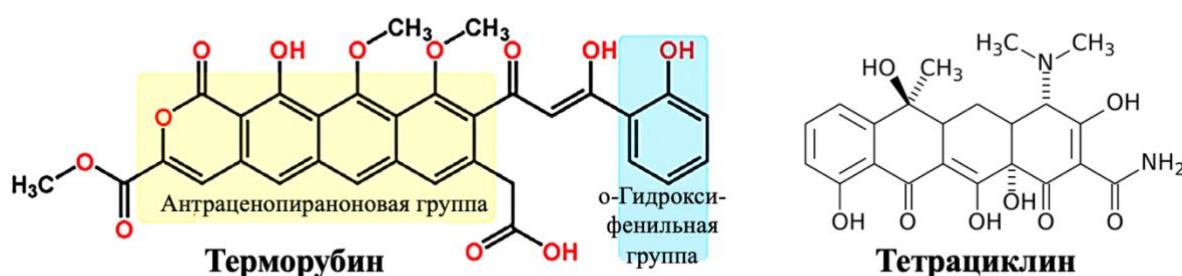


Рис. 47 Сравнение структуры терморубина и тетрациклина. Оба антибиотика содержат четыре конденсированных циклических шестичленных кольца. Антраценопираноновая группа выделена желтым прямоугольником, орто-гидроксифенильная группа выделена голубым прямоугольником.

Несмотря на широкий спектр действия, терморубин не применяется в клинических исследованиях из-за низкой растворимости из-за четырех ароматических колец [152] (рис. 47). Однако, в дальнейшем, рациональная модификация терморубина позволит использовать его в клинических исследованиях. Подробное строение терморубина с указанием нумерации атомов и ароматических колец представлено на рис. 48.

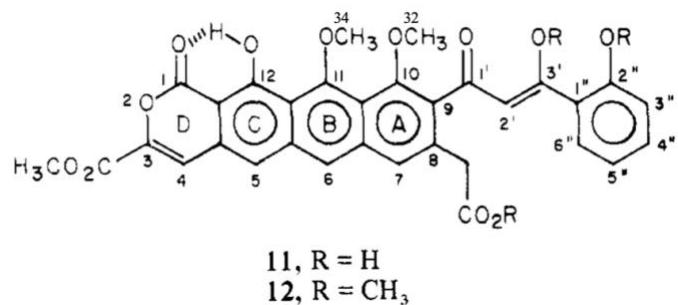


Рис. 48 Строение терморубина с нумерацией атомов и ароматических колец [152].

В 2012 году вышла работа, в которой была опубликована первая структура вакантной 70S рибосомы (из грамотрицательной бактерии *Thermus thermophilus*) в комплексе с терморубином [7]. Оказалось, что сайт связывания терморубина располагается в межсубъединичном B2а-мостики – на границе между 30S и 50S субъединицами рибосомы (рис. 49).

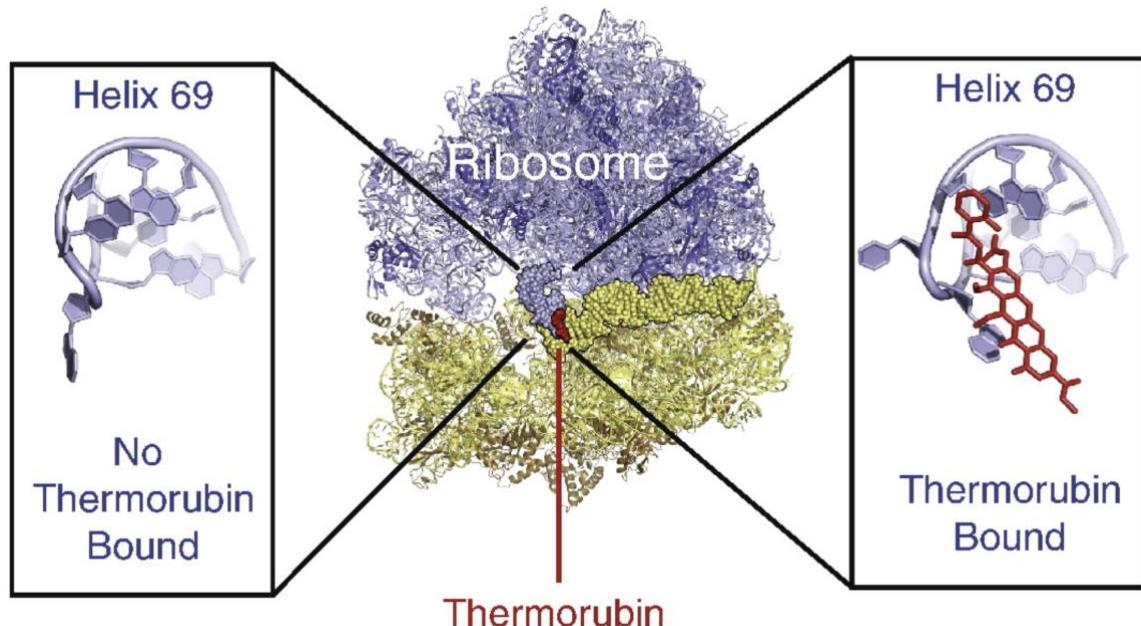


Рис. 49 Позиционирование терморубина в районе B2а-мостики на стыке большой и малой рибосомных субъединиц в вакантной 70S рибосоме рядом со спиралями H69 и H44. Терморубин показан красным цветом: орто-гидроксифенильная группа взаимодействует с U1915 в H69, а тетрациклическая группа располагается между остатком A1913 H69 23S pPHK и парой оснований C1409-G1491 в верхней части H44 16S pPHK (Необходимо отметить, что основание U1915 (при позиционировании терморубина в рибосоме) вытесняет основание C1914, выворачивая его в область связывания тРНК в А-сайте [7].

Из-за подобной локализации антибиотика было выдвинуто два предположения: а) терморубин препятствует размещению аминоацинированной тРНК в А-сайте рибосомы б) из-за конформационных изменений в области связывания факторов инициации антибиотик мешает доставке инициаторной fMet-tPHK^{fMet} в Р-сайт, ингибируя тем самым инициацию трансляции [7].

Однако в исследованиях [153], [154] было показано, что добавление терморубина к сформированным инициаторным комплексам 70S (с расположенной fMet-tPHK^{fMet} в Р-сайте) не мешало взаимодействию рибосом с пуромицином. Таким образом, размещение fMet-tPHK^{fMet} в Р-сайте не нарушалось в присутствии связанного с рибосомой терморубина.

Несмотря на то, что сайт связывания терморубина напрямую не перекрывает с сайтами связывания тРНК, при размещении антибиотика в районе B2а-мостики происходит выворачивание нуклеотида C1914 из H69, что, вероятно, препятствует связыванию аминоацил-tPHK в А-сайте рибосомы [7].

Поэтому исследователями в 2012 году была выдвинута гипотеза о механизме действия терморубина: нарушается размещение самой первой аминоацил-тРНК в А-сайте рибосомы. Хотя, кажется весьма маловероятным, что единственный нуклеотид C1914, (расположенный рядом с местом связывания аа-тРНК и имеющий множество степеней свободы для уклонения от столкновения с ней в А-сайте), может предотвратить ее позиционирование.

После публикации работы в 2012 году, не было никаких исследований о влиянии терморубина на другие стадии биосинтеза белка, отличные от инициации трансляции. Также, не было данных об остановках транслирующих рибосом вдоль мРНК, вызванных действием терморубина.

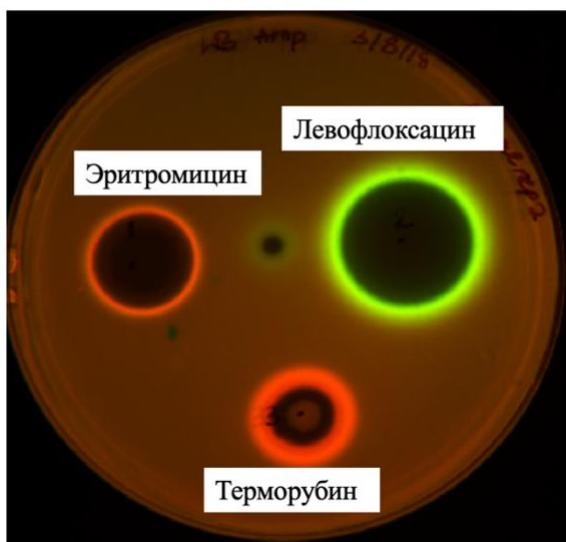
Безусловно, механизм действия терморубина вызывает множество вопросов и требует более детального изучения. Именно ему и будет посвящена 3 часть в «результатах и обсуждении».

3.1 Влияние терморубина на прокариотические клетки *in vivo*, а также *in vitro* трансляцию в системе на основе лизатов *E. coli* или системе из очищенных компонентов

Чистое вещество терморубина было любезно предоставлено доктором Francis Johnson.

Предполагаемый механизм действия терморубина (нарушение биосинтеза белка) сперва был подтвержден с помощью двойной репортерной системы. На агаризованные чашки Петри с репортерными штаммами *E. coli* $\Delta tolC$ и *E. coli* BW25113 был нанесен 1 мкл терморубина в концентрации 10 мг/мл вместе с контрольными антибиотиками – эритромицином (5 или 50 мг/мл) – макролидным антибиотиком, подавляющим биосинтез белка – и левофлаксоцином – ингибитором ДНК-гираз, индуцирующим SOS-ответ клетки (25 мкг/мл) (рис. 50).

E. coli $\Delta tolC$



E. coli BW25113

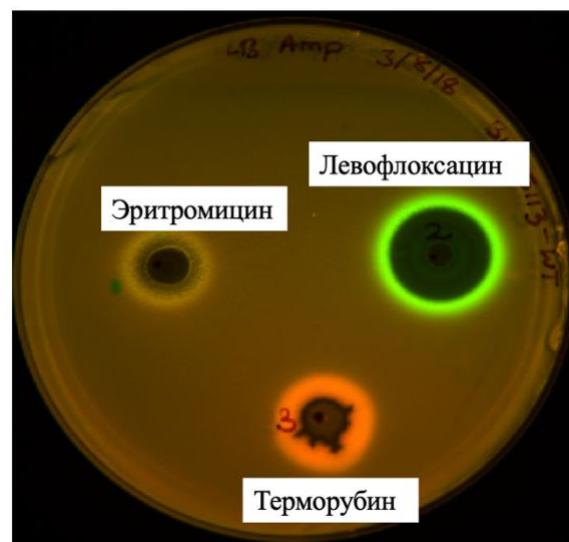


Рис. 50 Подтверждение влияния терморубина на биосинтез белка с помощью использования двойной репортерной системы DualRep2 на двух бактериальных штаммах - *E. coli* $\Delta tolC$ и *E. coli* BW25113 (дикий тип). Красный сигнал соответствует экспрессии белка Katushka2S, свидетельствующий о нарушении биосинтеза белка, зеленый – экспрессии RFP, вызванной индукцией SOS-ответа клетки. Контрольные антибиотики: эритромицин - 5 мг/мл для *E. coli* $\Delta tolC$ и 50 мг/мл для *E. coli* BW25113; левофлоксацин – в обоих случаях 25 мкг/мл; терморубин – в обоих случаях 10 мг/мл.

Терморубин продемонстрировал схожую активность как в случае грамотрицательной бактерии дикого типа (*E. coli* BW25113), так и в случае гиперчувствительного штамма *E. coli* $\Delta tolC$. В обоих случаях наблюдается индукция экспрессии белка Katushka2S, свидетельствующая об ингибировании биосинтеза белка при воздействии терморубина на бактериальные клетки.

После подтверждения первичного механизма действия терморубина, была определена минимальная ингибирующая концентрация на следующих бактериальных штаммах: *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$ (*KanR*), *E. coli* *lptDmut*, *E. coli* *SQ110 lptd*, *B. subtilis* 168 [155] (таблица 7).

Название штамма	Значение МИК, мкг/мл
<i>E. coli</i> JW5503 $\Delta tolC$ (<i>KanR</i>)	6.25
<i>E. coli</i> <i>lptDmut</i>	0.19
<i>E. coli</i> SQ110 <i>lptd</i>	3.12
<i>B. subtilis</i> 168	1.56
<i>E. coli</i> BW25113	6.25
<i>E. coli</i> SQ110 (<i>wt</i>)	12.5
<i>E. coli</i> SQ110 $\Delta tolC$	6.25
<i>E. coli</i> K-12	6.25

Таблица 7. Значение МИК терморубина на различных грамположительных и грамотрицательных штаммах.

После определения МИК, для подтверждения влияния терморубина на биосинтез белка, была проведена серия *in vitro* трансляций в системе из очищенных компонентов (PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit) (рис. 51), а также в системе на основе лизата *E. coli* (*E. coli* S30 Extract System for Linear Templates) (приложение 3, рис. 74).

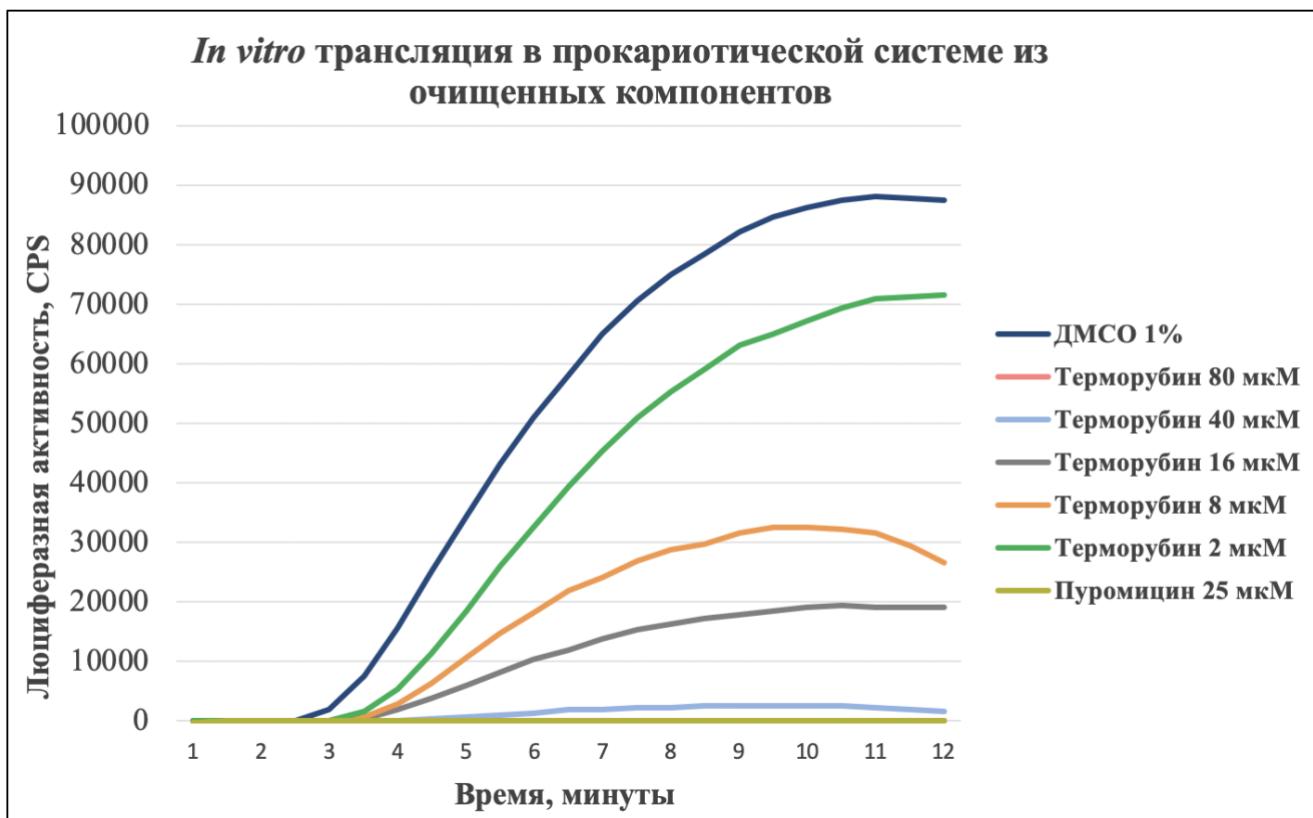


Рис. 51 Зависимость эффективности ингибирования *in vitro* трансляции от концентрации терморубина. Положительный контроль – желтая кинетическая кривая – пуромицин (25 мкМ); отрицательный контроль – 1% ДМСО (синяя кинетическая кривая); разные концентрации терморубина – от 2 до 80 мкМ (кинетические кривые представлены в зеленом, оранжевом, сером и голубом цветах). Кинетическая кривая, соответствующая 80 мкМ терморубину, полностью совпадает с кинетической кривой для пуромицина 25 мкМ. CPS – counts per second – количество импульсов в секунду.

Терморубин полностью подавляет *in vitro* трансляцию в концентрации 40 мкМ (25 мкг/мл), что несколько превышает значения МИК. Такую разницу можно интерпретировать тем, что в живой бактериальной клетке существует множество дополнительных мишней/преград, с которыми может связываться терморубин, вызывая гибель/прекращение деления клетки. В системе на основе чистых компонентов исключено взаимодействие антибиотика со сторонними белками и/или структурами клетки.

Поскольку известно, что терморубин не оказывает воздействия на биосинтез белка в эукариотических клетках, *in vitro* трансляция в системе на основе лизата HEK293T не производилась. Тем не менее для оценки влияния терморубина на клетки эукариот в целом был проведен МТТ-тест. Данные этого теста для терморубина были любезно предоставлены к.х.н. Скворцовым Д.А. (таблица 8).

Название клеточной линии	HEK293T	MCF7	A549	Va13
IC50, мг/мл	>25	>25	>25	>25

Таблица 8. Значения IC50 для терморубина. Использованы следующие клеточные линии – HEK293T - эмбриональные почки человека; A549 - альвеолярные эпителиальные клетки, выделенные из легочной ткани больного раком легких; MCF7 - эпителиальная клеточная линия, выделенная из молочной железы с метастатической аденокарциномой; Va13 – иммортализованная клеточная линия фибробластов, выделенная из человеческого легкого [156].

Терморубин показал низкую цитотоксичность по отношению к эукариотическим клеточным линиям, что делает его потенциальным кандидатом для вывода на фармацевтический рынок.

Основной задачей оставалось детальное изучение механизма действия терморубина всевозможными *in vitro* методами: изотопный и флуоресцентный toe-print анализ, анализ в BODIPY-системе, toe-seq метод, успешно разработанный к.х.н. Е. С. Комаровой в лаборатории О. А. Донцовой [9], быстрые измерения кинетики (в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги), а также рентген-структурный анализ и крио-ЭМ (в сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона). Параллельно с *in vitro* работой проводился отбор устойчивых к терморубину клонов на штамме *E. coli* *SQ110 lptd*.

3.2 Отбор устойчивых к терморубину клонов

Отбор устойчивых к терморубину клонов проводился, согласно методике, описанной в разделе «Материалы и методы».

Практически все возникшие мутации были выявлены в белках наружной мембранны и/или белках эффлюксных систем транспорта антибиотика (таблица 9).

Название белка, в котором произошла мутация	Характеристика белка
bamA	Фактор сборки белков наружной мембранны
yobF	Белок семейства DUF2527, белок теплового шока
mdoG	Белок биосинтеза глюканов MdoG
sapC	Пермеаза ABC-транспортера antimикробных пептидов
guaB	Инозинмонофосфатдегидрогеназа
ldhA	Ферментативная НАД-зависимая D-лактатдегидрогеназа
mprA	Транскрипционный репрессор синтеза микроцина B17 и часть эффлюксной системы экспорта [157].

Таблица 9. Мутации в белках у штаммов, устойчивых к терморубину.

К сожалению, отбор устойчивых клонов не выявил никаких значимых мутаций для определения механизма действия терморубина и/или его места связывания в геноме.

3.3 Изучение механизма действия терморубина с использованием *in vitro* методов

Чтобы определить влияние терморубина на биосинтез белка, необходимо было детально изучить аспекты механизма его действия:

1. Влияние терморубина на инициацию трансляции;
2. Блокировка терморубином A-сайт рибосомы;
3. Воздействие терморубина на элонгацию и/или терминацию трансляции.

1.3.1 Терморубин не оказывает влияния на инициацию трансляции

Для того, чтобы выяснить, оказывает ли терморубин влияние на инициацию трансляции были поставлены следующие эксперименты: а) Профилирование рибосом в градиенте сахарозы для выявления накопленных недиссоциированных 70S рибосом; б) сравнение *in vitro* трансляции при добавлении канонических мРНК (содержащих 5'НТО) или безлидерных мРНК (без 5'НТО); в) остановка реакции на этапе сборки инициаторного комплекса без последующей элонгации (за счет добавления в каждую реакцию тиострептона).

1.3.1.1 Терморубин приводит к накоплению недиссоциированных 70S рибосом

Накопление недиссоциированных 70S рибосом приводит к уменьшению количества свободных рибосомных субъединиц 30S и 50S, что, в свою очередь, косвенно ингибирует инициацию трансляции. Чтобы проверить данную теорию было проведено профилирование рибосом в градиенте плотности сахарозы с добавлением терморубина (рис. 52).

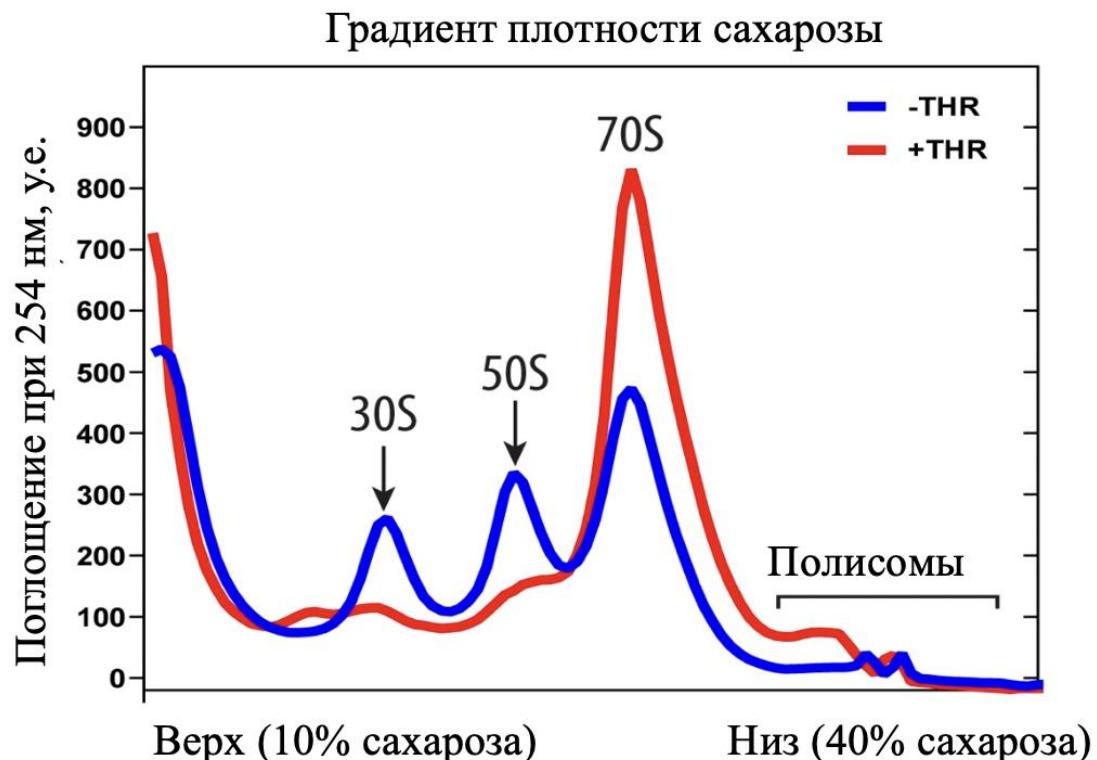


Рис. 52 Профилирование рибосом в градиенте плотности сахарозы с добавлением (красная линия) и без добавления (синяя линия) терморубина (THR, 62.5 мкг/мл – 10x значение МИК). У.Е. – единицы поглощения (AU).

Были подтверждены ранее опубликованные данные [153]: при воздействии терморубина количество недиссоциированных 70S рибосом возрастает (приблизительно в 4 раза), а количество отдельных 30S и 50S субъединиц, напротив, снижается. Тем не менее невозможно было отличить, происходило ли накопление 70S рибосомных субъединиц во время трансляции или это вакантные рибосомы, не задействованные в биосинтезе белка, но стабилизированные терморубином. Таким образом необходимо было проверить: ингибирует ли терморубин трансляцию исключительно из-за того, что он препятствует диссоциации субъединиц.

1.3.1.2 Влияние терморубина на *in vitro* трансляцию канонических и безлидерных мРНК

В классическом варианте (осуществляется на мРНК, содержащих 5'НТО) обязательно происходит диссоциация рибосомных субъединиц, которая предшествует инициации трансляции, в отличие от неканонического варианта (на безлидерных мРНК), где инициация трансляции осуществляется 70S вакантными рибосомами [157], [158]. Чтобы проверить, влияние

терморубина на классическую и неканоническую трансляции, был поставлен эксперимент на двух мРНК матрицах (классической и безлидерной) в присутствии и без добавления терморубина (рис. 53).

Если бы терморубин являлся ингибитором именно канонической инициации трансляции (препятствовал диссоциации субъединиц), то не ожидалось, что он будет ингибировать трансляцию безлидерной мРНК.

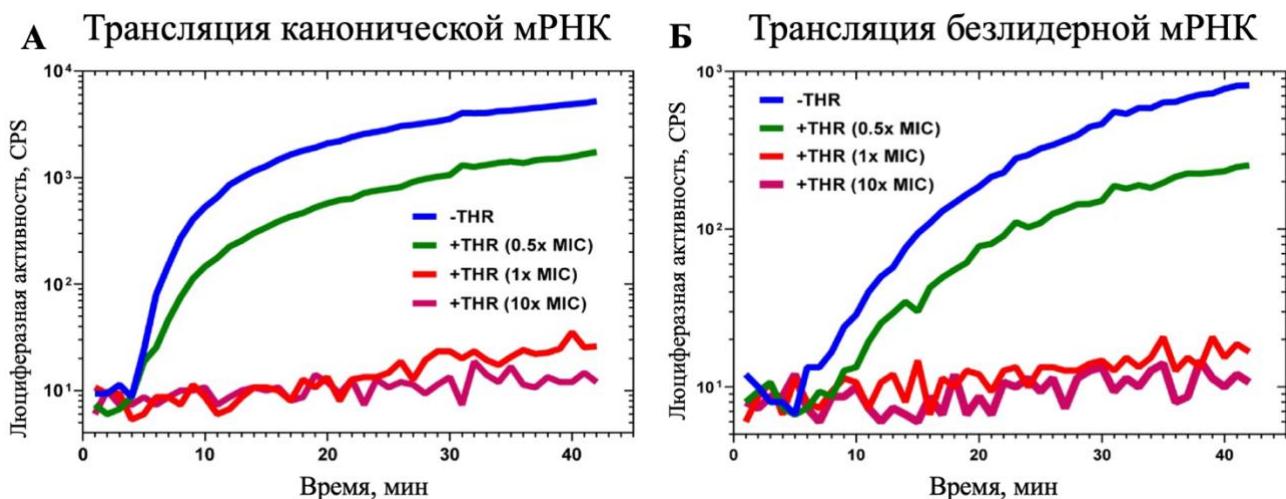


Рис. 53 Ингибиование *in vitro* трансляции терморубином на канонических (рис. А) и безлидерных (рис. Б) мРНК. Синтез люциферазы *in vitro* без добавления терморубина (THR) (синяя кинетическая кривая) и в присутствии терморубина (в концентрациях, равных 0.5x (3.125 мкг/мл) – зеленая линия, 1x (6.25 мкг/мл) – красная линия и 10x (62.5 мкг/мл) МИК – пурпурная линия. На графике представлены средние значения трех независимых экспериментов. CPS – counts per second – количество импульсов в секунду.

Поскольку терморубин подавил трансляцию на канонических (с 5'-НТО) и безлидерных (без 5'-НТО) мРНК в равной степени, то, был сделан вывод о том, что ингибиование биосинтеза белка происходило не только потому, что терморубин препятствовал диссоциации рибосомных субъединиц. Отсюда следовало, что терморубин влиял именно на процессы элонгации и/или терминации трансляции, а не на инициацию.

1.3.1.3 Терморубин не мешает сборке инициаторного комплекса

Еще один вариант классического toe-print анализа со сборкой инициаторного комплекса без последующего этапа элонгации трансляции, позволил окончательно подтвердить отсутствие влияние терморубина на инициацию трансляции (рис. 54). Этап элонгации был заблокирован добавлением антибиотика тиострептона (50 мкМ), мешающего связыванию EF-Tu и EF-G факторов с 50S рибосомной субъединицей. Важно отметить, что места связывания терморубина и тиострептона не перекрываются, т. е. стерически мешать действию друг друга они не способны (Приложение 3, рис. 75).

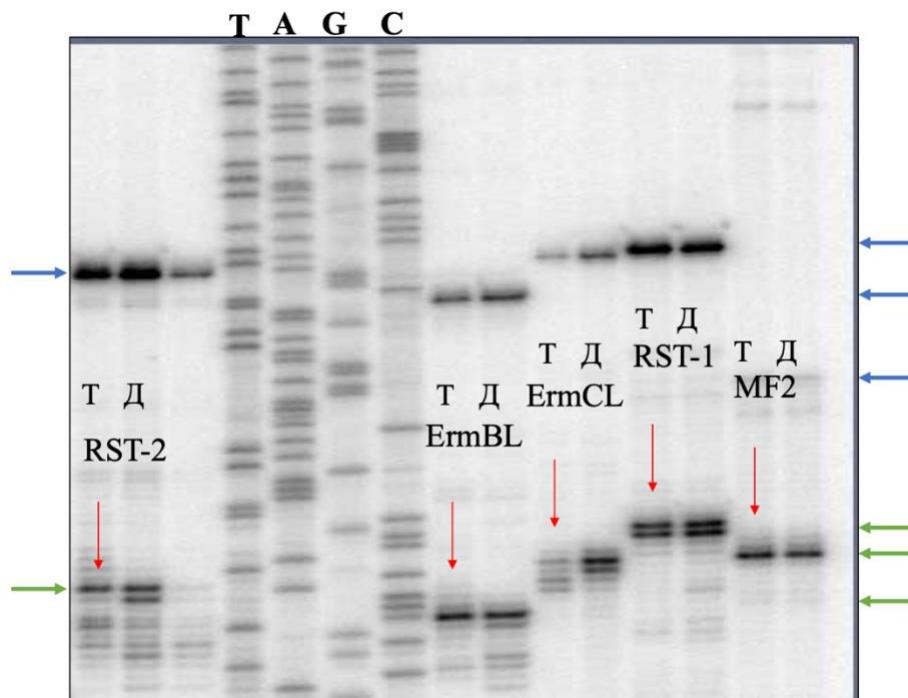


Рис. 54 Toe-print анализ на RST-2, ErmBL, ErmCL, RST-1 и MF2-матрицах. (T, A, G, C) – дорожки секвенирования последовательности гена *ermBL*. Во все реакции добавлен тиострептон в концентрации 50 мкМ; Т – терморубин (80 мкМ), Д - ДМСО 1%. Синими стрелочками обозначены полноразмерные матрицы κ ДНК RST-2, ErmBL, ErmCL, RST-1 и MF2. Зелеными стрелочками обозначены остановки на старт-кодонах, вызванные действием антибиотика тиострептона или тиострептона вместе с терморубином.

Во всех реакциях в присутствии терморубина наблюдалась остановка на старт-кодоне, соответствующая продукту обратной транскрипции. Если бы терморубин влиял на инициацию трансляции (препятствовал сборке инициаторного комплекса), то полосы в районе старт-кодона не детектировались.

1.3.2 Терморубин не блокирует стерически А-сайт рибосомы

Следующим важным этапом являлось определение положения терморубина, относительно А-сайта рибосомы, с которым связываются и аа-тРНК, и факторы терминации. Для этого были поставлены следующие эксперименты: А) Рентген-структурный анализ рибосомы с терморубином с вакантным А-сайтом и Б) Крио-ЭМ рибосомы с терморубином с аа-тРНК в А-сайте (в сотрудничестве с научной группой М. Г. Гагнона).

1.3.2.1 Терморубин не влияет на расположение тРНК в Р-сайте

Чтобы подтвердить, что терморубин действительно не мешает факторам трансляции, аа-тРНК или токсинам связываться в А-сайте рибосом, было принято решение с помощью Крио-ЭМ получить структуру рибосомы с терморубином, но не вакантную, как было сделано в работе 2012 года [7], а с расположенными в А- или и в А-, и в Р-сайтах тРНК. Для этого в сотрудничестве с

научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона, были кристаллизованы рибосомы *T. thermophilus* (Tth) 70S в присутствии мРНК (5'-GGC-AAG-GAG- GUA-AAA-AUG-UAA-3'), инициаторной деацетилированной тРНК^{fMet} и терморубина. Структура была определена с разрешением 2,7 Å. Высокое разрешение было получено благодаря стабилизации рибосом при включении в их структуру мРНК и тРНК в P-сайт (рис. 55).

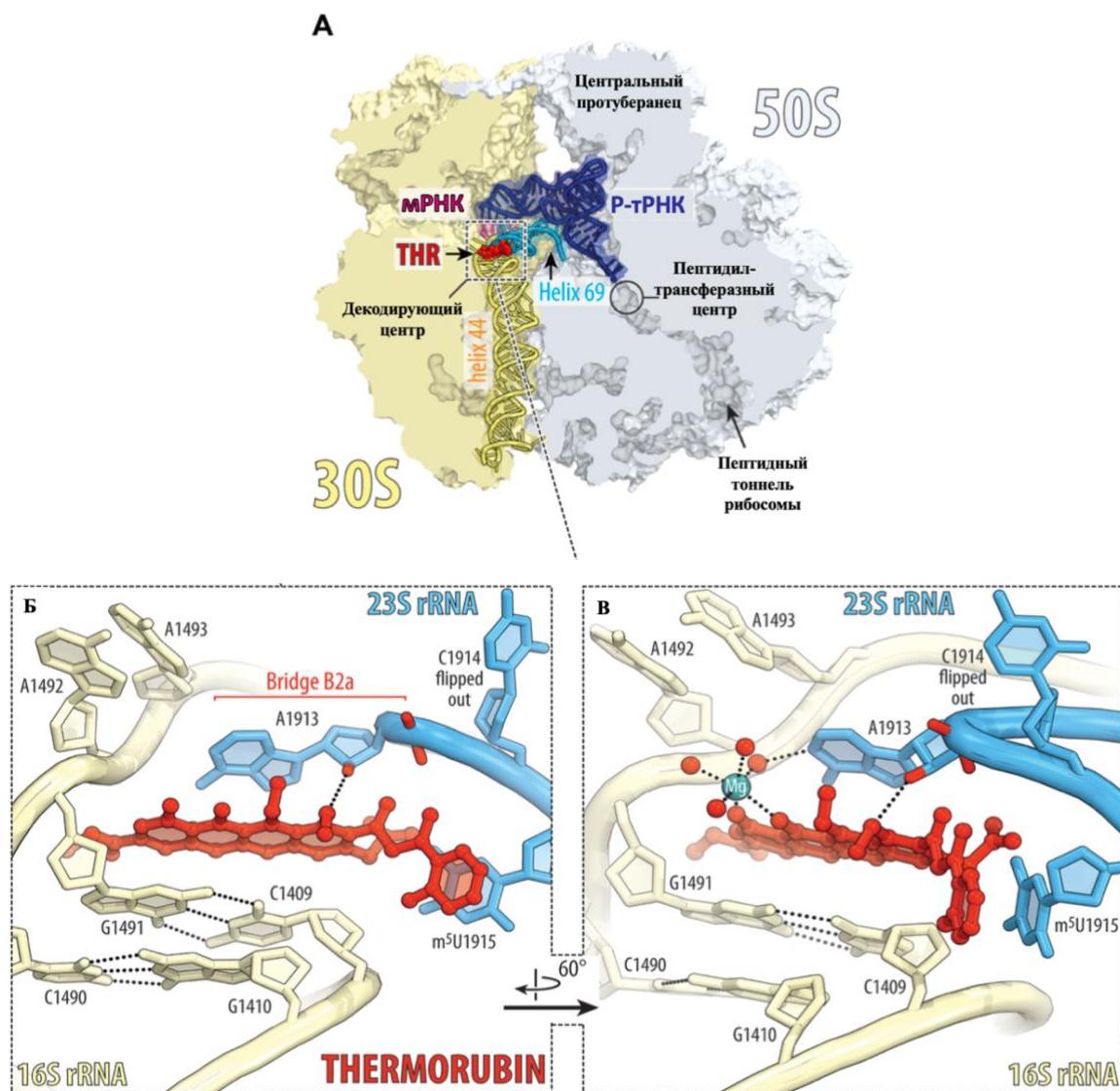


Рис. 55 Рентгеноструктурное изображение комплекса 70S-THR с тРНК в P-сайте. (А) – место связывания терморубина (THR) (красный цвет) с 70S рибосомой *T. thermophilus*, содержащей мРНК (пурпурный цвет) и деацетилированную инициаторную тРНК в P-сайте (синий цвет). 30S рибосомная субъединица показана желтым цветом; а 50S – серым. Спирали 69 и 44 23S и 16S рРНК выделены голубым и ярко-желтым цветом, соответственно. (Б, В) – Расположение терморубина рядом с декодирующими центром рибосомы. Пунктирными линиями обозначены водородные связи. Связывание терморубина приводит к смещению нуклеотида C1914 относительно его обычного положения в отсутствие тРНК в А-сайте, а также к смещению нуклеотидов A1492 и A1493 16S рРНК из H44. (В сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона).

Положение терморубина в полученной структуре и изменения положений ключевых нуклеотидов соответствовали ранее опубликованным данным [7]: тетрациклический фрагмент располагается между C1409:G1491 16S рРНК с одной стороны и азотистым основанием A1913 23S рРНК с другой; при связывании терморубина $m^5\text{U}1915$ занимает место C1914, который в свою очередь, вынужден сместиться.

Важно, что присутствие инициаторной тРНК в Р-сайте, а также мРНК не повлияло на позиционирование терморубина внутри рибосомы.

1.3.2.3 Терморубин и А-сайтовая тРНК способны сосуществовать в рибосоме

Было выявлено, что терморубин не мешает связыванию инициаторной тРНК в Р-сайте, однако вопрос про связывание аа-тРНК с А-сайтом все еще оставался открытым. Для того чтобы проверить отсутствие конкуренции между аа-тРНК и терморубином, была определена структура с помощью крио-ЭМ (с разрешением 2,7 Å): рибосомы *E. coli* 70S, с расположеннымными Phe-тРНК^{Phe} (А-сайт) и инициаторной тРНК^{fMet} (Р-сайт) в присутствии терморубина (рис. 56).

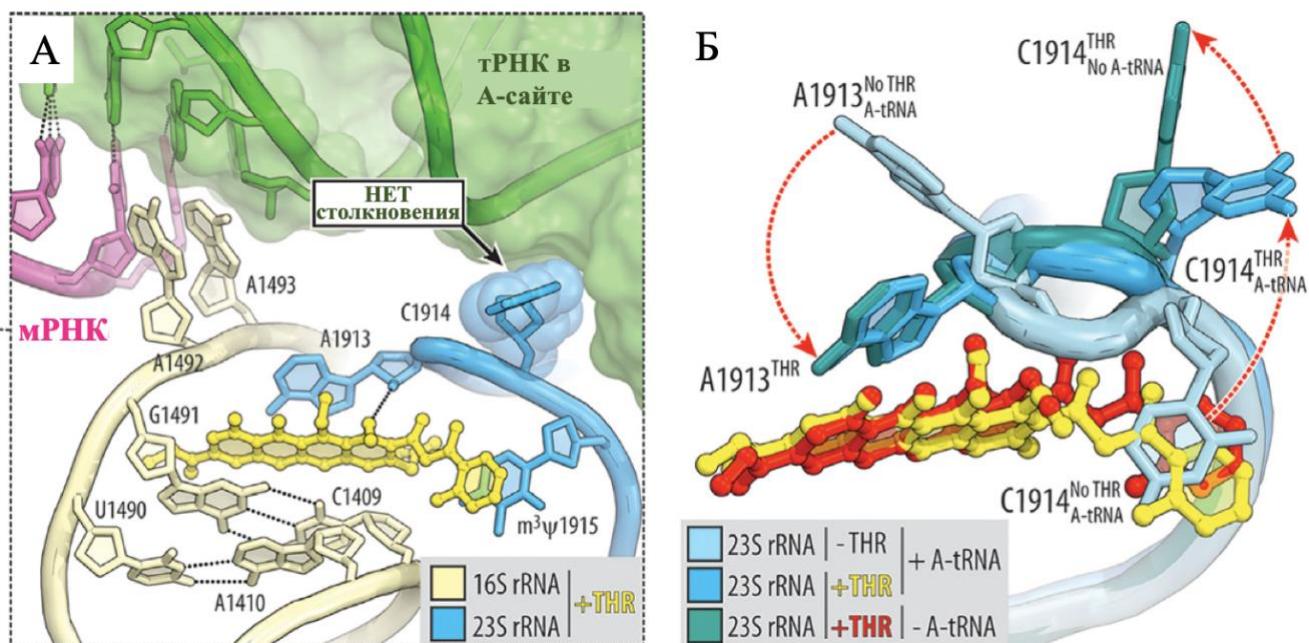


Рис. 56 Крио-ЭМ структура комплекса 70S с терморубином и расположенными тРНК как в А-, так и в Р-сайтах (расположение терморубина рядом с декодирующем центром рибосомы). (А) C1914 принимает новую конформацию, в которой он не мешает связыванию тРНК. (Б) Структурные перестройки в декодирующем центре (красные пунктирные стрелки) при связывании терморубина и размещении тРНК в А-сайте: C1914 выворачивается таким образом, что позволяет тРНК правильно расположиться (переход от светло-голубого цвета к синему). В отсутствие тРНК в А-сайте C1914 полностью выворачивается (переход от синего цвета к сине-зеленому). (В сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона).

Таким образом, терморубин позволяет разместить аа-тРНК в А-сайте рибосомы, при этом основной нуклеотид C1914 принимает необычную конформацию, оставляя сайт связывания

терморубина неизменным. Далее будет показано, что эти результаты имели ключевое значение в объяснении полученных данных в ходе toe-print анализов на различных матрицах.

1.3.3 Терморубин оказывает влияние на элонгацию и/или терминацию трансляции

Как оказалось, терморубин не воздействовал на инициацию трансляции, тем не менее биосинтез белка в его присутствии подавлялся. Следовательно, терморубин оказывал влияние на элонгацию и/или терминацию трансляции.

Чтобы это проверить, были спланированы следующие эксперименты:

А) Классический изотопный и флуоресцентный toe-print анализы с использованием различных ДНК-матриц; Б) Выявление сиквенс-специфичного контекста остановки рибосом под воздействием терморубина (toe-seq анализ и модификации ErmC матрицы); В) конкуренция терморубина с RelE токсином за связывание в А-сайте рибосомы; Г) быстрая кинетика и А-сайтовые измерения константы диссоциации пептидил-тРНК при воздействии терморубина (в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги); Д) Моделирование структуры рибосомы в присутствии терморубина и факторов терминации I класса (в сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона); Е) Изучение влияние терморубина на терминацию трансляции с помощью BODIPY-системы.

1.3.3.1 Терморубин вызывает различные остановки рибосом вдоль мРНК матрицы

Первым разработанным и на сегодняшний день основным способом определения механизма действия антибиотика является toe-print анализ (изотопный [69] или недавно опубликованный флуоресцентный [159]). Поэтому было принято решение выявить влияние терморубина на элонгацию и/или терминацию трансляции с помощью данных методов.

Сперва была проведена серия экспериментов на разных ДНК-матрицах: ErmBL, RST-1, RST-2, ErmCL (рис. 57-58). Сперва был проведен анализ с использованием двух из них - ErmBL и RST-2.

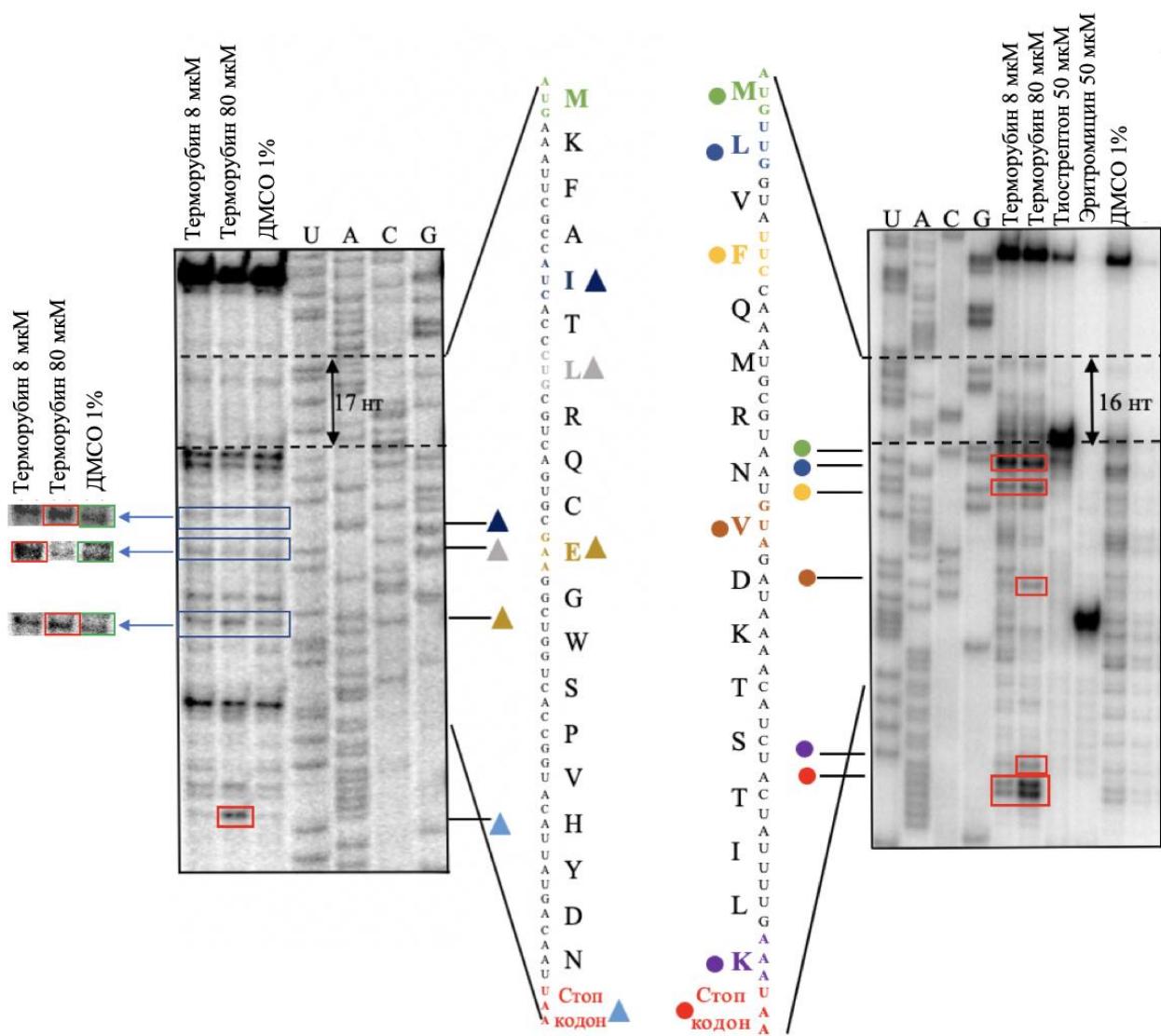


Рис. 57 Toe-print анализ с использованием матрицы RST-2 (слева) и ErmBL (справа). Для RST-2 матрицы: 1 и 2 дорожки - терморубин в концентрации 8 и 80 мкМ; 3- отрицательный контроль 1% ДМСО; 4-7 дорожки (U, A, C, G) – дорожки секвенирования последовательности гена *rst-2*. Треугольниками обозначены остановки рибосомы вдоль мРНК. Для ErmBL: 1-4 дорожки (U, A, C, G) – дорожки секвенирования последовательности гена *ermBL*, 5-6 дорожки – терморубин в концентрации 8 и 80 мкМ, 7-9 дорожки – тиострептон (50 мкМ) и эритромицин (50 мкМ), в качестве положительных контролей; 1% ДМСО – отрицательный контроль. Кружочками обозначены кодоны, на которых происходит остановка рибосом при движении вдоль мРНК. Все остановки соответствуют Р-сайтовому расположению в рибосоме за исключением стоп-кодона – А-сайт.

На матрицах RST-2 (синтетическая матрица, кодирующая 20 разных аминокислот) и ErmBL (природная матрица, кодирующая последовательность лидера пептида, расположенного перед генами устойчивости к макролидам) заметен ряд остановок вдоль всей мРНК, а также яркие полосы в районе стоп-кодона. А вот на старт-кодоне для терморубина полос практически не видно, что указывает на отсутствие проблем с инициацией трансляции. (Если бы терморубин влиял на инициацию трансляции и формирование первой пептидной связи (как

изначально предполагалось), то в районе старт-кодона на геле детектировались бы продукты обратной транскрипции. Обратно: если влияния нет, то и полос в районе старт-кодона не будет).

Полученные результаты оказались весьма неожиданными, поэтому было принято решение протестировать терморубин и на других матрицах – ErmC, TrpL, RST-1. На основании полученных данных с помощью toe-print анализа был собрана общая таблица основных остановок рибосом, вызванных терморубином (таблица 10)

Матрица	Остановки (Р-сайт):		
	номер	кодона	-
	аминокислота		Остановки (А-сайт)
ErmBL	2 – Leu (UUG) 4 – Phe (CUG) 9 – Cys (UGC) 17 – Lys (AAA)		3 – Val (GUA) 5 – Gln (CAA) 10 – Asp (GAU) Стоп-кодон (UAA)
ErmC	2- Gly (GGC) 7 - Phe (TTT) 11 -Thr (ACA) 13 - His (CAT) 18 - Lys (AAA)		3 - Ile (ATT) 8 - Val (GTA) 12 -Val (GTT) 14 - Tyr (TAT) 19 - Lys (AAA)
RST-1	1 – Старт-кодон (AUG) 7 - Arg (CGT) 21 - Ala (GCC)		2 - Tyr (TAT) 8 - Gln (CAG) 22 – Стоп-кодон (UAA)
RST-2	5 – Ile (AUC) 7 – Leu (CUG) 11 – Glu (GAA) 12 Gly (GGC)		6 – Thr (ACC) 8 – Arg (CGU) 12 – Gly (GGC) Стоп-кодон (UAA)
TrpL	14 - Ser (TCC)		Стоп-кодон (UAA)

Таблица 10. Основные остановки рибосом вдоль мРНК на различных матрицах под воздействием терморубина. Жирным шрифтом выделены стоп-кодоны (RST-1, RST-2, TrpL, ErmBL матрицы), а также старт-кодон на RST-1 матрице.

Действительно, на большинстве матриц терморубин вызывает остановку на стоп-кодоне, вероятно ингибируя терминацию трансляции. Также есть ряд остановок вдоль всей мРНК.

1.3.3.2 Выявление сиквенс-специфичного контекста остановки рибосом под воздействием терморубина

Поскольку на каждой матрице терморубин вел себя по-разному, то, возможно, рибосомы останавливались на определенном нуклеотидном контексте. Чтобы проверить эту гипотезу было принято решение модифицировать ErmCL матрицу (природная матрица, подобная ErmBL), заменив последовательность второго и третьего кодонов (таблица 11, рис. 58).

Название, номер кодона	Сиквенс кодона	Кодируемая аминокислота	Описание
CggcF (2)	GGC	Глицин (Gly)	Исходный второй кодон
CgggF (2)	GGG	Глицин (Gly)	Синонимичная замена
CgccF (2)	GCC	Аланин (Ala)	Измененный второй кодон
CataF (3)	ATA	Изолейцин (Ile)	Синонимичная замена
CgctF	GCT	Аланин (Ala)	Измененный третий кодон

Таблица 11. Варианты второго и третьего кодонов на модифицированных ErmCL матрицах.

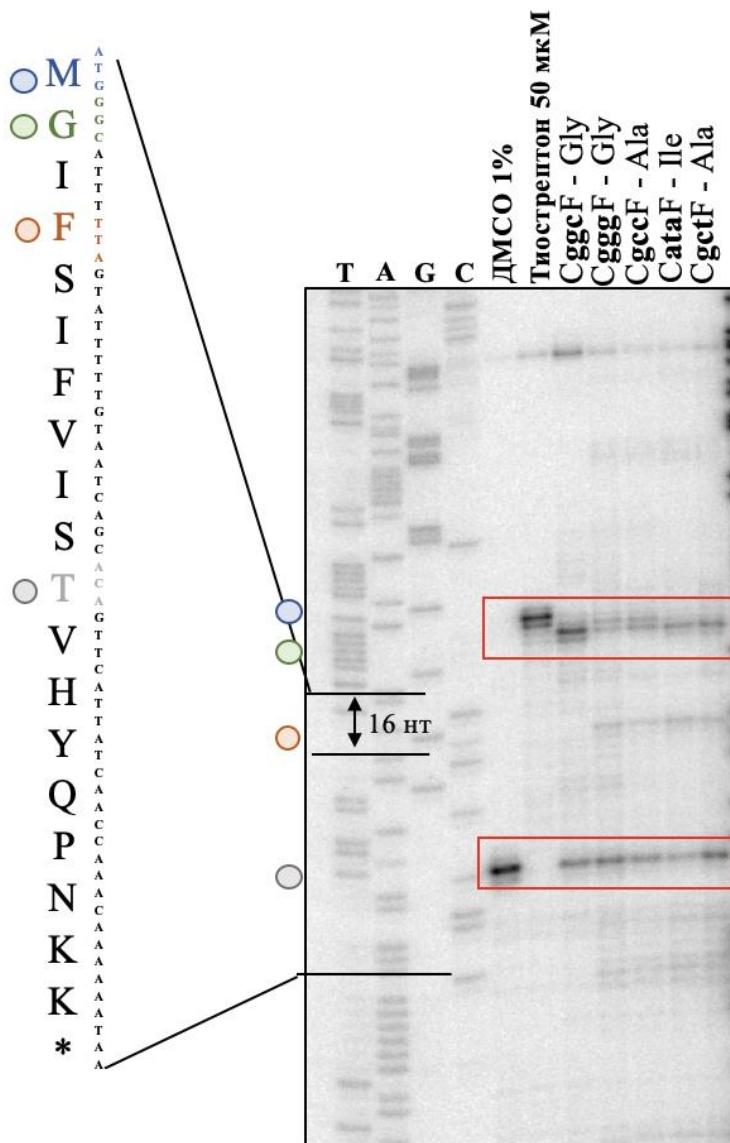


Рис. 58 Toe-print анализ с использованием модифицированных ErmCL матриц. 1–4 дорожки (T, A, G, C) – дорожки секвенирования последовательности гена *ermCL*, 5 дорожка – отрицательный контроль 1% ДМСО, 6 – положительный контроль – тиострептон (50 мкМ), 7–11 дорожки – терморубин (80 мкМ) на модифицированных матрицах ErmCL (7 – исходная матрица, 8 – матрица с синонимичной заменой второго кодона, 9 – матрица с заменой второго кодона (кодирует аланин вместо глицина), 10 – матрица с синонимичной заменой третьего кодона, 11 – матрица с заменой третьего кодона (кодирует аланин вместо изолейцина)). Кружочками обозначены кодоны, на которых происходит остановка рибосом при движении вдоль мРНК, звездочкой – стоп-кодон. Все остановки соответствуют Р-сайтовому расположению в рибосоме.

Модификации второго и третьего кодонов ErmCL матрицы не повлияли на остановки рибосом – они детектировались в районе второго кодона. Отсюда можно сделать два разных вывода: 1) выявить сиквенс-специфичный контекст таким простым способом невозможно 2) не существует зависимости между нуклеотидным контекстом и остановкой рибосом под действием терморубина.

Флуоресцентный toe-print анализ, к сожалению, также не дал дополнительной значимой информации, поскольку (по сравнению с изотопным toe-print), у него более низкая

чувствительность (Приложение 3, рис. 76 и 77). Также во время проведения экспериментов было выявлено несколько значимых особенностей флуоресцентного toe-print анализа: а) для него требуется большое количество ДНК-матрицы (200 нг, в изотопном – достаточно 20-40 нг), б) существуют проблемы с нормализацией сигнала. Данные сложности с реализацией метода накладывают значительные ограничения на его применение.

В лаборатории О. А. Донцовой был разработан уникальный метод «toe-seq» для определения нуклеотидного контекста, на котором останавливаются рибосомы под действием антибиотиков [9].

Для его реализации использовали набор всевозможных рандомизированных матриц (более 37000), toe-print анализ и секвенирование нового поколения. Матрицы представляли собой мРНК, содержащие 10 рандомизированных кодонов и уникальные последовательности в 3'НТО (Приложение 3, рис. 78). Все расчеты были произведены в сотрудничестве с научной группой М. Р. Кабилова. (Toe-print анализ представлен в приложении 3, рис. 79).

К сожалению, выявить сиквенс-специфичность данным методом также не получилось. Обрыв трансляции на всех матрицах происходил после включения 2–3 аминокислот в растущий пептид.

1.3.3.3 Терморубин не конкурирует с RelE токсином в А-сайте рибосомы

Поскольку место связывания терморубина (район В2а-мостика) располагается рядом с А-сайтом (Приложение 3, рис. 75), и при его позиционировании происходит выворачивание C1914 23S рРНК, возможно было предположить, что антибиотик мог конкурировать с различными от аа-тРНК структурами в А-сайте, в частности с RelE токсином. Для того, чтобы это проверить, был поставлен классический изотопный toe-print анализ на ErmCL матрице в присутствии боррелидина (ингибитора треониновых тРНК-синтетаз, вызывающий остановку рибосом на треониновом кодоне), с или без добавления терморубина и RelE токсина.

Если терморубин стерически мешал бы связыванию RelE токсина, то разрезание свободной мРНК в А-сайте, когда рибосомы останавливаются на определенных кодонах под действием терморубина (второй кодон – глицин, как было видно из рис. 59) и боррелидина – (11 кодон – треонин) не происходило бы. Напротив, если конкуренции с токсином нет, то мРНК бы беспрепятственно разрезалась и на геле визуализировались более короткие продукты.

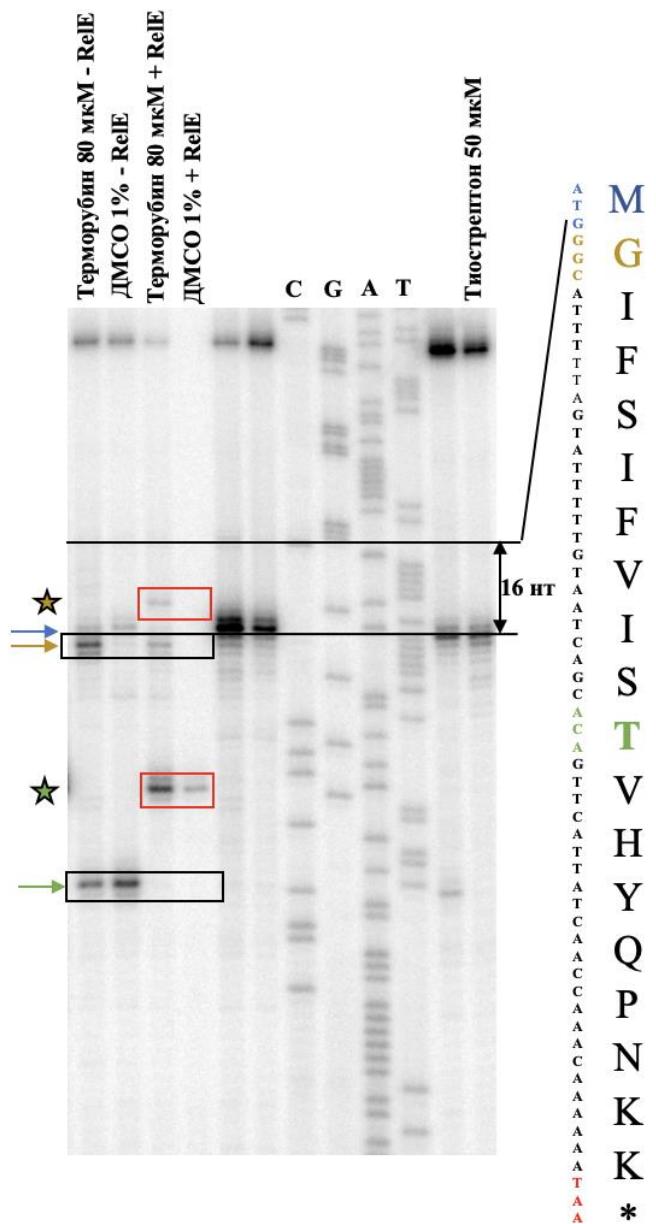


Рис. 59 Toe-print анализ на *ErmCL* матрице. В каждую реакцию был добавлен боррелидин (50 мкМ). С, Г, А, Т – дорожки секвенирования последовательности гена *ermCL*; 1 дорожка – терморубин (80 мкМ) без добавления RelE токсина; 2 дорожка – контроль - 1% ДМСО без добавления RelE токсина, 3 дорожка - терморубин (80 мкМ) с RelE токсином; 4 дорожка - контроль - 1% ДМСО с RelE токсином. Контрольный антибиотик - тиострептон (50 мкМ). Черными прямоугольниками обозначены остановки под действием терморубина (второй кодон – оранжевая стрелка – глицин) и 11 кодон (боррелидиновый стоп – треониновый кодон – зеленая стрелка). Старт-кодон обозначен синий стрелкой. Красными прямоугольниками обозначены продукты, высвободившиеся после действия RelE токсина.

При добавлении токсина на геле детектировались продукты более короткой длины, по сравнению с дорожками, где RelE не был добавлен, следовательно терморубин не мешал связыванию токсина в А-сайте рибосомы.

1.3.3.4 Быстрая кинетика и А-сайтовые измерения константы диссоциации пептидил-тРНК из рибосомы при воздействии терморубина

Поскольку нуклеотидного контекста, на котором останавливаются рибосомы под влиянием терморубина выявить не удалось, в сотрудничестве с научным коллективом А. Л. Коневеги, была предложена серия экспериментов (с использованием реконструированной системы трансляции *in vitro*), нацеленная на изучение влияние терморубина на: а) доставку аа-тРНК в А-сайт; б) пептидил-трансферазную реакцию; в) транслокацию.

Влияние терморубина на доставку аа-тРНК (в форме тройного комплекса (EF-Tu•GTP•Phe-тРНК^{Phe} (Prf16/17)) в А-сайт (UUU кодон) оценивали с помощью детекции флуоресценции с остановленным потоком: увеличение флуоресценции соответствовало начальному связыванию тройного комплекса с рибосомой и распознаванию кодона, (происходил гидролиз GTP), а затухание флуоресценции – высвобождению тРНК из GDP*EF-Tu и размещению тРНК в А-сайте рибосомы (рис. 60, А).

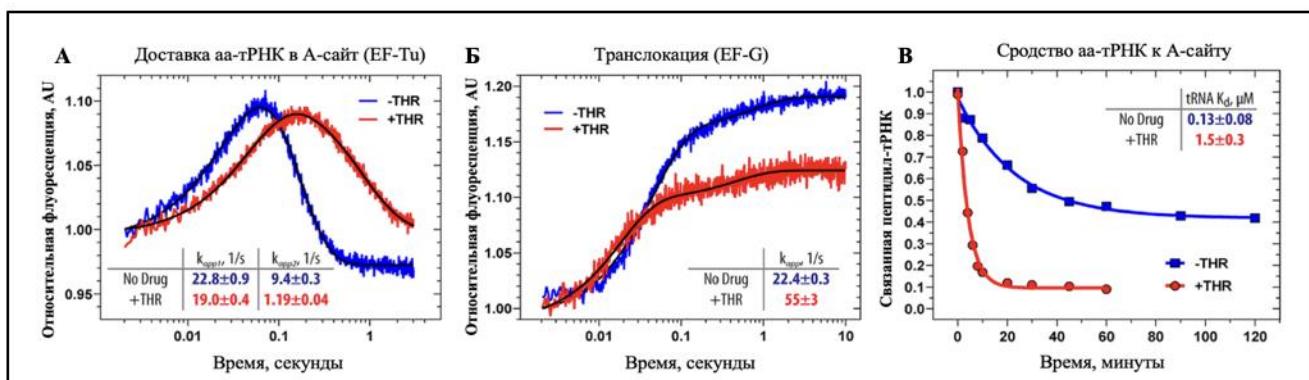


Рис. 60 Влияние терморубина на элонгацию трансляции. (А) Кинетика связывания аа-тРНК в А-сайте рибосомы (взаимодействие 0,1 М тройного комплекса EF-Tu•GTP•Phe-тРНК^{Phe} (Prf16/17)) с 70S рибосомами, содержащими инициаторную тРНК^{fMet} в Р-сайте) в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) терморубина. (Б) Кинетика транслокации (взаимодействие рибосом 70S, содержащих деацетилированную инициаторную тРНК^{fMet} в Р-сайте и fMet-Phe-тРНК^{Phe} (Prf16/17) в А-сайте, с EF-G) в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) терморубина. (В) Диссоциация пептидил-тРНК из А-сайта из претранслокационных рибосомных комплексов 70S в отсутствии (синяя кривая) или в присутствии (красная кривая) терморубина. Каждая кинетическая кривая представляет собой усредненное значение 5–7 экспериментальных повторов. Стандартные отклонения рассчитывались с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. (В сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги).

Как видно из рис. 60 (А) скорость аккомодации тРНК примерно в 8 раз снижалась под воздействием терморубина.

Количество образованного дипептида также было снижено, вероятно, в связи с влиянием терморубина на расположение аа-тРНК в А-сайте.

Влияние терморубина на транслокацию оценивалось кинетически по изменению флуоресценции при добавлении GTPase EF-G к претранслокационному комплексу, содержащему

флуоресцентно меченную fMet-Phe-tRNK^{Phe} (Prf16/17) в А-сайте и деацилированную инициаторную tRNK^{fMet} в Р-сайте (рис. 60 Б, В): скорость транслокации (перенос пептидил-tRNK из А-сайта в Р-сайт) возрастила в 2,5 раза под влиянием терморубина, при этом интенсивность флуоресценции снижалась на 30%.

По этим данным терморубин не препятствовал связыванию аа-tRNK в А-сайте, но приводил к ее дестабилизации.

Глобально, при дестабилизации аа-tRNK в А-сайте существуют два потенциальных сценария: а) перед транслокацией происходит высвобождение дипептида из рибосомы (абортование трансляции) б) случается быстрая транслокация и перенос пептидил-tRNK в Р-сайт.

1.3.3.5 Моделирование структуры рибосомы в присутствии терморубина и факторов терминации трансляции I класса

При анализе данных, полученных флуоресцентным и изотопным toe-print анализами, были выявлены остановки рибосом на стоп-кодонах на матрицах ErmBL, RST-1, RST-2. Возможно, позиционирование терморубина в районе В2а-мостика мешает расположению факторов терминации I класса в А-сайте (RF1 или RF2). В сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона была смоделирована структура 70S рибосом (*T. thermophilus* или *E. coli*) с терморубином и RFs I класса в А-сайте (рис. 61).

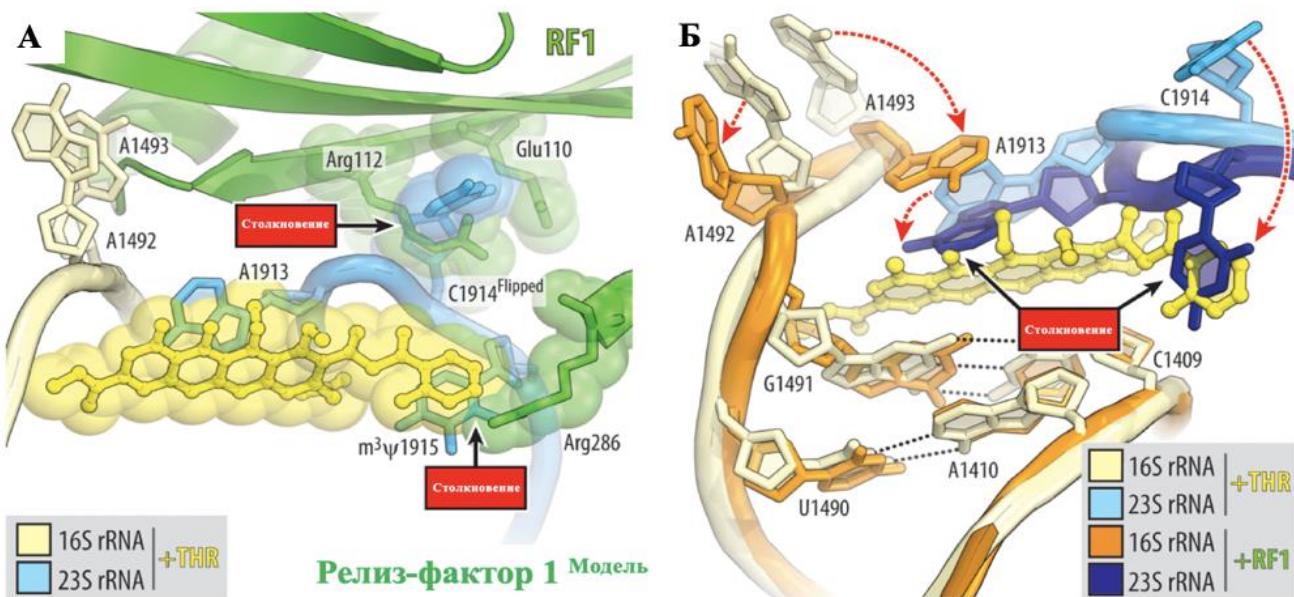


Рис. 61 Гипотетическая модель, в которой терморубин мешает связыванию RFs I класса в A-сайте рибосомы. (А) Наложение связанного с рибосомой RF1 [160] на комплекс 70S рибосомы со связанным терморубином в районе B2a-мостика и тРНК в A- и P-сайтах. Вывернутая позиция C1914 не мешает расположению RFs. (Б) Структурные перестройки в декодирующем центре рибосомы при связывании RF1 с 70S рибосомой (пунктирные красные стрелки): связывание факторов терминации трансляции I класса приводит к изменению положения нуклеотидов A1492, A1493 16S pРНК и A1913 23S, стерически несовместимых с расположенным в рибосоме терморубином.

Гипотетически предсказанная модель исключала взаиморасположение терморубина и RFs I класса в рибосоме, т. е. подтверждала идею об ингибировании терминации трансляции терморубином.

Для того, чтобы подтвердить данную гипотезу, был проведен эксперимент с использованием разработанной BODIPY-системы.

1.3.3.6 Изучение влияния терморубина на терминацию трансляции с помощью BODIPY-системы

Как было описано «Результаты и обсуждение, часть 1», разработанная BODIPY-система имеет ряд преимуществ, по сравнению с другими *in vitro* методами: простота в использовании и быстрота получаемого результата. Главной особенностью системы является возможность определения влияния антибиотика по отдельности на каждую стадию биосинтеза белка.

Для подтверждения влияния терморубина на терминацию трансляции была использована ДНК-матрица M (AUGUAA), сопряженная система для транскрипции-трансляции (PURExpress Delta (aa, tRNA) Kit (раствор A без аминокислот и аминоацил-tРНК), а также PURExpress® Δ RF123 Kit (раствор B без факторов терминации), исходная BODIPY-Met-tРНК^{fMet} вместе с fMet-tРНК^{fMet} и отдельный раствор с факторами терминации (из PURExpress® Δ RF123 Kit) (рис. 62).

Трансляция на подобной матрице позволила бы определить влияние терморубина на терминацию трансляции: если воздействие существует, то даже добавление факторов терминации (RFs 1+3) не приводило бы к высвобождению продуктов реакции.

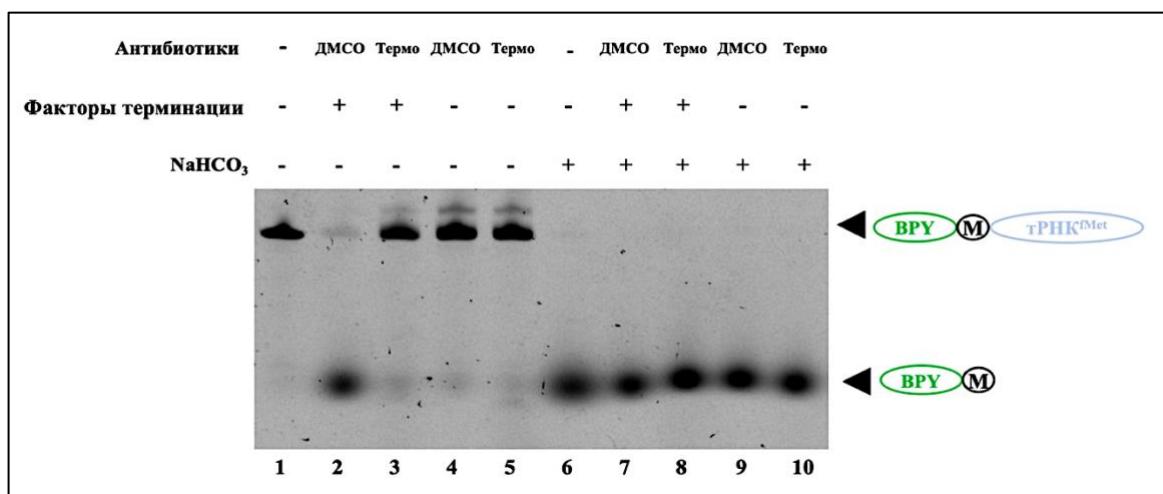


Рис. 62 Изучение механизма действия терморубина с помощью BODIPY-системы. Продукты *in vitro* трансляции мРНК (с ДНК-матрицы), кодирующей M, в присутствии исходной BPY-Met-tРНК^{fMet}. Дорожки 1–5 соответствуют продуктам трансляции до гидролиза сложноэфирной связи 1 M NaHCO₃; дорожки 6–10 – продуктам трансляции после гидролиза 1 M NaHCO₃. Дорожка 1 и 6 соответствуют исходной BPY-Met-tРНК^{fMet}. Отрицательный контроль – 1% ДМСО без антибиотика представлен на дорожке 2, 4, 7 и 9; Термо – терморубин (концентрация 40 мкМ) – дорожки 3, 5, 8 и 10. В дорожках 2-3 и 7-8 добавлены факторы терминации (RFs 1+3). BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — тРНК^{fMet}.

Поскольку было доказано, что терморубин не влиял на инициацию трансляции, то полученные результаты были однозначно интерпретированы: терморубин оказывал воздействие на терминацию трансляции, так как при добавлении факторов терминации, продукт BODIPY-M не высвобождался.

Подводя итоги, были сделаны следующие выводы:

- 1) Терморубин не влияет на инициацию трансляции;
- 2) Терморубин существует в рибосоме с тРНК, связанными в A- и P-сайтах;
- 3) Терморубин воздействует на несколько этапов элонгации трансляции, дестабилизируя аа-тРНК в A-сайте рибосомы;
- 4) Сиквенс-специфичность остановок, вызванных воздействием терморубина, не была выявлена;
- 5) Терморубин при связывании в районе B2a-мостика, вызывает структурные перестройки, которые мешают связыванию RFs I класса в A-сайте рибосомы, что приводит к ингибированию процесса терминации трансляции.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными коллег, опубликованными в 2023 году [161]. Во-первых, была получена крио-ЭМ-структура 70S рибосом в комплексе с терморубином с разрешением 1,96 Å с размещенной в P-сайте fMet-tРНК^{fMet}; во-вторых, было показано, что терморубин не ингибит ассоциацию 30S и 50S субъединиц рибосом; в-третьих, коллеги продемонстрировали, что терморубин не мешает связыванию aa-tРНК в A-сайте, но заметно снижает ее аккомодацию и в-четвертых, они показали, что терморубин ингибит RF-опосредованное высвобождение пептида (в частности, позиции нуклеотидов A1492, A1493 и A1913 при связывании терморубина в районе B2a-мостике стерически мешают размещению факторов терминации I класса) и последующую рециркуляцию рибосом.

Кроме того, для возможности использования терморубина в клинике необходима его рациональная модификация. Например, добавление небольших по размеру гидроксильных групп к тетрациклической группировке, незначительно изменяющих расположение терморубина внутри рибосомы, вероятно, улучшит растворимость антибиотика в воде. В работе автора [13], было показано, что модификации терморубина по метильной группе (34) (взаимодействует с 2'-гидрооксилом A1913) и о-гидроксифенильной группе (стыкуется с m⁵U1915) невозможны, поскольку именно по этим позициям терморубин участвует во взаимодействиях с рибосомой. Однако, метильную группу (32) можно заменить на гидроксильную группу (данная позиция терморубина не участвует напрямую во взаимодействиях с рибосомой); более того, гипотетически возможно уменьшить число π-электронов в сопряжении для увеличения растворимости терморубина, делая его похожим на тетрациклин (рис. 47, 48, 55 и 56).

Выводы

1. Разработана BODIPY-система на основе флуоресцентно меченного метионина, позволяющая детектировать в денатурирующем полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевину, короткие пептиды (длиной до 7 аминокислотных остатков).
2. Показано, что в BODIPY-системе трансляции детектируется воздействие антибиотиков на этапы биосинтеза белка: инициацию, пептидилтрансферазную реакцию, транслокацию и терминацию трансляции.
3. Используя разработанную BODIPY-систему трансляции показано, что антибиотик цистоцин действует так же, как структурный аналог – пуромицин: останавливает пептидилтрансферазную реакцию, акцептируя на себя растущую цепочку пептида с образованием пептидил-цистоцина.
4. Впервые показано воздействие терморубина на элонгацию и терминацию трансляции у прокариот, при этом не выявлено ранее предполагаемого прямого влияния на инициацию.
5. Терморубин дестабилизирует аа-тРНК в А-сайте, что приводит к преждевременной терминации биосинтеза белка или к ускоренной транслокации, в результате которой пептидил-тРНК оказывается в Р-сайте рибосомы.

Заключение

В ходе данной работы была разработана уникальная BODIPY-система трансляции для анализа механизма действия антибиотиков, ингибирующих биосинтез белка. Преимущество данной системы заключается в простоте ее использовании, дешевизне и быстроте получаемых результатов. BODIPY-система позволяет визуализировать очень короткие продукты синтеза с разрешением до 1 аминокислоты с использованием денатурирующего РНК ПААГ. Метод позволяет изучать терминацию, инициацию и элонгацию трансляции по отдельности, а также влияние антибиотиков на данные этапы.

Использование BODIPY-системы позволило дополнительно подтвердить механизмы действия для двух исследованных антибиотиков – цистоцина и терморубина. Оказалось, что цистоцин – структурный аналог пуромицина – имеет схожий с ним механизм действия: переносит на себя растущий полипептид, способствуя тем самым абортированию трансляции. Однако, в отличии от пуромицина, цистоцин менее токсичен для эукариотических клеток, что делает его потенциальным кандидатом на использования в клинических исследованиях.

Ранее считавшийся ингибитором инициации трансляции терморубин, напротив, не оказывает влияния на данный этап. Благодаря полученным структурным данным (крио-ЭМ), а также данным *in vitro* методов (toe-print анализ, быстрая кинетика) было показано, что терморубин влияет на процесс элонгации, дестабилизируя аа-тРНК в А-сайте, что приводит к двум событиям: преждевременному обрыву синтеза белка или ускоренной транслокации, в результате которой пептидил-тРНК оказывается в Р-сайте рибосомы. Кроме того, было продемонстрировано воздействие терморубина на терминацию трансляции: расположение терморубина в районе В2а-мостике стерически мешает связыванию RFs в А-сайте рибосомы. Данная работа может послужить хорошей базой для дальнейшей химической модификации молекулы, открывающей возможность для его использования в клинике.

Благодарности

Автор выражает безграничную благодарность всем, кто помогал и поддерживал во время проведения исследования и написания работы.

В первую очередь хотелось выразить благодарность научным руководителям – с.н.с, к.х.н. Дмитрию Александровичу Лукьянову и д.х.н., член-корр. РАН Петру Владимировичу Сергиеву за их неоценимый вклад в планирование экспериментов, развитие направления исследования, всесторонней помощи в обсуждении результатов и подготовке научных публикаций. Отдельно хочется поблагодарить д.х.н. Илью Андреевича Остремана за изначальный выбор темы, объекта исследования и консультирования по полученным результатам на протяжении всей работы.

Огромная благодарность заведующей лабораторией д.х.н, академику РАН Ольге Анатольевне Донцовой за предоставление возможности реализации научных исследований, важных замечаний по мере продвижения проектов.

Автор благодарит своих коллег и друзей, с которыми осуществлялась работа в лаборатории О. А. Донцовой – Принца Мавизу, Полину Зотову, Владиславу Сагитову, а также Артема Ферберга. Автор выражает отдельную благодарность Медине Биджиевой за помощь с объяснением принципов работы приборов для измерения кинетических кривых, а также помощи по интерпретации результатов быстрой кинетики.

Благодаря мотивации, вере и всесторонней поддержке друзей, работа всегда развивалась, появлялись идеи, чтобы получить новые значимые результаты.

Безусловно, работа не могла бы состояться без вклада наших коллег: к.х.н. Алферовой В.А. (в LC-MS, ВЭЖХ, ЯМР анализы), научных групп М. Г. Гагнона и Ю. С. Поликанова (крио-ЭМ), А. Л. Коневеги (быстрая кинетика).

Также хотелось поблагодарить всю мою семью, которая на протяжении 6 лет выполнения работы оказывала моральную поддержку и давала возможность учиться и заниматься любимым делом.

Список литературы

1. Fleming A. Regulatory issues for nuclear power plant life management // ATW - Internationale Zeitschrift fur Kernenergie. 1929. Vol. 46, № 4. P. 245–250.
2. WAKSMAN S.A. What is an antibiotic or an antibiotic substance? // Mycologia. 1947. Vol. 39, № 5. P. 565–569.
3. Nicolaou K.C., Rigol S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis // J. Antibiot. (Tokyo). Nature Publishing Group, 2018. Vol. 71, № 2. P. 153–184.
4. Ruiz-Pérez R., Newman-Portela A.M., Ruiz-Fresned M.A. Emerging global trends in next-generation alternatives to classic antibiotics for combatting multidrug-resistant bacteria // J. Clean. Prod. 2024. Vol. 478, № September.
5. Osterman I.A. et al. Madumycin II inhibits peptide bond formation by forcing the peptidyl transferase center into an inactive state. 2017. P. 1–8.
6. Bulkley D., Johnson F., Steitz T.A. The Antibiotic Thermorubin Inhibits Protein Synthesis by Binding to Inter-Subunit Bridge B2a of the Ribosome // J. Mol. Biol. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 416, № 4. P. 571–578.
7. Bulkley D., Johnson F., Steitz T.A. The Antibiotic Thermorubin Inhibits Protein Synthesis by Binding to Inter-Subunit Bridge B2a of the Ribosome // J. Mol. Biol. 2012. Vol. 416, № 4. P. 571–578.
8. Lee H.C. et al. Cystocin, a novel antibiotic, produced by Streptomyces sp. GCA0001: Biological activities // Arch. Pharm. Res. 2003. Vol. 26, № 6. P. 446–448.
9. Sergiev P. et al. Context specificity of translation inhibitors revealed by toe-seq. 2024.
10. Marina V.I. et al. An easy tool to monitor the elemental steps of in vitro translation via gel electrophoresis of fluorescently labeled small peptides // Rna. 2024. Vol. 30, № 3. P. 298–307.
11. Tolicheva O.A. et al. Separation of Short Fluorescently Labeled Peptides by Gel Electrophoresis for an In Vitro Translation Study // Nanobiotechnology Reports. 2024. Vol. 19, № 3. P. 423–431.
12. Alferova V.A. et al. Mining Translation Inhibitors by a Unique Peptidyl-Aminonucleoside Synthetase Reveals Cystocin Biosynthesis and Self-Resistance // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, № 23.
13. Paranjpe M.N. et al. Insights into the molecular mechanism of translation inhibition by the ribosome-targeting antibiotic thermorubin // Nucleic Acids Res. 2023. Vol. 51, № 1. P. 449–462.
14. Марина В.И., Сагитова В.Э., Ферберг А.С., Биджиева М.С., Толичева О.А., Полесскова Е.В., Коневега А.Л., Остерман И.А., Донцова О.А. С.П.В. Сборник тезисов докладов, VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024 и XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ. 2024.
15. Биджиева М.С., Толичева О.А., Марина В.И., Сагитова В.Э., Донцова О.А., Сергиев П.В., Полесскова Е.В. К.А.Л. Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним;

Школа-конференция для молодых ученых «Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним». 2023.

16. Биджиева М.С., Толичева О.А., Марина В.И., Сагитова В.Э., Донцова О.А., Сергиев П.В., Полесскова Е.В. К.А.Л. Усовершенствованная система детектирования полипептидов; Сборник тезисов докладов X Всероссийского молодежного научного форума с международным участием “Open Science 2023.” 2023.
17. Yamamoto H. et al. 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. Vol. 113, № 9. P. E1180–E1189.
18. Rodnina M. V. Translation in prokaryotes // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2018. Vol. 10, № 9. P. 1–21.
19. Goyal A. et al. Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № 22. P. 10700–10712.
20. Duval M. et al. Multiple ways to regulate translation initiation in bacteria: Mechanisms, regulatory circuits, dynamics // Biochimie. 2015. Vol. 114. P. 18–29.
21. Milón P., Rodnina M. V. Kinetic control of translation initiation in bacteria // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2012. Vol. 47, № 4. P. 334–348.
22. Grigoriadou C. et al. A Quantitative Kinetic Scheme for 70 S Translation Initiation Complex Formation // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 373, № 3. P. 562–572.
23. Milon P. et al. Kinetic Checkpoint at a Late Step in Translation Initiation // Mol. Cell. 2008. Vol. 30, № 6. P. 712–720.
24. Ogle J.M., Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity // Annu. Rev. Biochem. 2005. Vol. 74. P. 129–177.
25. Jenner L. et al. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step // Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 17, № 9. P. 1072–1078.
26. Kothe U., Rodnina M. V. Delayed release of inorganic phosphate from elongation factor Tu following GTP hydrolysis on the ribosome // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 42. P. 12767–12774.
27. Satterthwait A.C., Jencks W.P. The Mechanism of the Aminolysis of Acetate Esters // J. Am. Chem. Soc. 1974. Vol. 96, № 22. P. 7018–7031.
28. Wasserman M.R. et al. Multiperspective smFRET reveals rate-determining late intermediates of ribosomal translocation // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. Vol. 23, № 4. P. 333–341.
29. Belardinelli R. et al. Translocation as continuous movement through the ribosome // RNA Biol. Taylor & Francis, 2016. Vol. 13, № 12. P. 1197–1203.
30. Ralph A. Bradshaw G.W.H. and P.D.S. No Title [Electronic resource] // Academic Press. 2023. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128216248/encyclopedia-of-cell-biology-second-edition>.
31. Bulkley D. et al. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome //

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. Vol. 107, № 40. P. 17158–17163.
- 32. Panteleev P. V. et al. Ruminicidins are a family of mammalian host-defense peptides plugging the 70S ribosome exit tunnel // *Nat. Commun.* . Springer US, 2024. Vol. 15, № 1.
 - 33. Zavialov A. V. et al. Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3 // *Mol. Cell.* 2002. Vol. 10, № 4. P. 789–798.
 - 34. Korostelev A. et al. Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 50. P. 19684–19689.
 - 35. Gao N. et al. Mechanism for the disassembly of the posttermination complex inferred from Cryo-EM studies // *Mol. Cell.* 2005. Vol. 18, № 6. P. 663–674.
 - 36. Karimi R. et al. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation // *Mol. Cell.* 1999. Vol. 3, № 5. P. 601–609.
 - 37. Singh N.S. et al. Evidence for a role of initiation factor 3 in recycling of ribosomal complexes stalled on mRNAs in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 17. P. 5591–5601.
 - 38. Frank J., Agrawal R.K. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation // *Nature.* 2000. Vol. 406, № 6793. P. 318–322.
 - 39. Barat C. et al. Progression of the Ribosome Recycling Factor through the Ribosome Dissociates the Two Ribosomal Subunits // *Mol. Cell.* 2007. Vol. 27, № 2. P. 250–261.
 - 40. Pai R.D. et al. Structural Insights into Ribosome Recycling Factor Interactions with the 70S Ribosome // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 376, № 5. P. 1334–1347.
 - 41. Lampinen J., Virta M., Karp M. Comparison of gram positive and gram negative bacterial strains cloned with different types of luciferase genes in bioluminescence cytotoxicity tests // *Environ. Toxicol. Water Qual.* 1995. Vol. 10, № 2. P. 157–166.
 - 42. Holzenkämpfer M. et al. Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. II. Structure elucidation and biosynthesis // *J. Antibiot.* (Tokyo). 2002. Vol. 55, № 3. P. 301–307.
 - 43. Osterman I.A. et al. 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. Vol. 60, № 12. P. 7481–7489.
 - 44. Galluzzi L., Karp M. Amplified detection of transcriptional and translational inhibitors in bioluminescent *Escherichia coli* K-12 // *J. Biomol. Screen.* 2003. Vol. 8, № 3. P. 340–346.
 - 45. Möhrle V., Stadler M., Eberz G. Biosensor-guided screening for macrolides // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 388, № 5–6. P. 1117–1125.
 - 46. Aviv G., Gal-mor O. Chapter 5 Gene Regulation in Bacterial Pathogens // *Host-Pathogen Interact. Methods Protoc.* 2018. Vol. 1734. P. 39–45.
 - 47. Shapiro E., Baneyx F. Stress-activated bioluminescent *Escherichia coli* sensors for antimicrobial agents detection // *J. Biotechnol.* 2007. Vol. 132, № 4. P. 487–493.

48. Shen X. et al. An improved method with high sensitivity and low background in detecting low β -galactosidase expression in mouse embryos // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 5. P. 1–11.
49. Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 73, № 6. P. 1251–1258.
50. Mofford D.M., Reddy G.R., Miller S.C. Latent luciferase activity in the fruit fly revealed by a synthetic luciferin // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014. Vol. 111, № 12. P. 4443–4448.
51. Sergiev P. V. et al. Application of reporter strains for new antibiotic screening // Biomeditsinskaya Khimiya. Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia, 2016. Vol. 62, № 2. P. 117–123.
52. Billard P., DuBow M.S. Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories // Clin. Biochem. 1998. Vol. 31, № 1. P. 1–14.
53. Kisly I. et al. Luciferase-based reporter system for in vitro evaluation of elongation rate and processivity of ribosomes // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 2021. Vol. 49, № 10. P. 1–12.
54. Costantino D.A. et al. tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES // Nat. Struct. Mol. Biol. 2008. Vol. 15, № 1. P. 57–64.
55. Bonderoff J.M., Lloyd R.E. Time-dependent increase in ribosome processivity // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, № 20. P. 7054–7067.
56. Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior // Chem. Rev. 2002. Vol. 102, № 3. P. 759–781.
57. Merzlyak E.M. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime // Nat. Methods. 2007. Vol. 4, № 7. P. 555–557.
58. Rizzo M.A. et al. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22, № 4. P. 445–449.
59. Quillardet P. et al. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1982. Vol. 79, № 19 I. P. 5971–5975.
60. El Mzibri M. et al. The *Salmonella* sulA-test: A new in vitro system to detect genotoxins // Mutat. Res. - Genet. Toxicol. 1996. Vol. 369, № 3–4. P. 195–208.
61. Sergiev P. V. et al. Application of reporter strains for new antibiotic screening // Biomeditsinskaya Khimiya. Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia, 2016. Vol. 62, № 2. P. 117–123.
62. Остерман И. А. Поиск и изучение новых антибиотиков ингибиторов синтеза белка. Дис. д-ра. хим. наук 02.00.10 и 03.01.03 / Остерман И.А. – Москва, 2018. Р. 1–291.
63. Bertrand K. et al. The attenuator of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. Heterogeneous 3'-OH termini in vivo and deletion mapping of functions // J. Mol. Biol. 1977. Vol. 117, № 1. P. 227–247.
64. Hartz D. et al. Extension inhibition analysis of translation initiation complexes. 1988. Vol. 164,

№ 1986. P. 419–425.

65. Polikanov Y.S. et al. Distinct tRNA Accommodation Intermediates Observed on the Ribosome with the Antibiotics Hygromycin A and A201A // Mol. Cell. Elsevier Inc., 2015. Vol. 58, № 5. P. 832–844.
66. Szal T. et al. Identifying the targets of aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors by primer extension inhibition. 2013. Vol. 41, № 14. P. 1–9.
67. Orelle C. et al. Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. Vol. 57, № 12. P. 5994–6004.
68. Moazed D., Noller H.F. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome // Nature. 1989. Vol. 342, № 6246. P. 142–148.
69. Vazquez-laslop N., Thum C., Mankin A.S. Molecular Mechanism of Drug-Dependent Ribosome Stalling. 2008. P. 190–202.
70. Egorova T. et al. Engelhardt Institute of Molecular Biology , The Russian Academy of Sciences 119991 , // Methods. Elsevier Inc., 2019. № 2019.
71. Gould P.S., Bird H., Easton A.J. Translation toeprinting assays using fluorescently labeled primers and capillary electrophoresis // Biotechniques. 2005. Vol. 38, № 3. P. 397–400.
72. Hwang J., Buskirk A.R. A ribosome profiling study of mRNA cleavage by the endonuclease RelE. 2017. Vol. 45, № 1. P. 327–336.
73. Pedersen K. et al. The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site. 2003. Vol. 112. P. 131–140.
74. Vorstenbosch E. et al. The G222D mutation in elongation factor Tu inhibits the codon-induced conformational changes leading to GTPase activation on the ribosome // EMBO J. 1996. Vol. 15, № 23. P. 6766–6774.
75. Paleskava A. et al. Differential contribution of protein factors and 70s ribosome to elongation // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 17. P. 1–14.
76. Vinogradova D.S. et al. How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs // PLoS Biol. 2020. Vol. 18, № 1. P. 1–25.
77. Polacek N. et al. SPARK - A novel method to monitor ribosomal peptidyl transferase activity // Biochemistry. 2002. Vol. 41, № 39. P. 11602–11610.
78. Maksimova E.M. et al. Multifaceted Mechanism of Amicoumacin A Inhibition of Bacterial Translation // Front. Microbiol. 2021. Vol. 12, № February.
79. Wintermeyer W., Zachau H.G. [53] Replacement of odd bases in tRNA by fluorescent dyes. 1974. P. 667–673.
80. Murray M.G., Thompson W.F. Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research // Methods. 1980. Vol. 12, № 21. P. 8235–8251.
81. Noma A. et al. Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic

- phenylalanine tRNA // *EMBO J.* 2006. Vol. 25, № 10. P. 2142–2154.
82. Stevens B. et al. Fret-based identification of mRNAs undergoing translation // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 5.
83. Kaur A., Kaur P., Ahuja S. Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof (Anal. Methods (2020) 12 (5532–5550) DOI: 10.1039/D0AY01961E) // *Anal. Methods.* Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 13, № 5. P. 730.
84. Jiao Y. et al. Fluorescent sensing of fluoride in cellular system // *Theranostics.* 2015. Vol. 5, № 2. P. 173–187.
85. Thommen M., Draycheva A., Rodnina M. V. Ribosome selectivity and nascent chain context in modulating the incorporation of fluorescent non-canonical amino acid into proteins // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group UK, 2022. Vol. 12, № 1. P. 1–14.
86. Nakata H. et al. Binding efficiency of elongation factor Tu to tRNAs charged with nonnatural fluorescent amino acids // *Anal. Biochem.* 2006. Vol. 348, № 2. P. 321–323.
87. Savelbergh A. et al. An Elongation Factor G-Induced Ribosome Rearrangement Precedes tRNA-mRNA Translocation // *Mol. Cell.* 2003. Vol. 11, № 6. P. 1517–1523.
88. Liutkute M. et al. Gradual compaction of the nascent peptide during cotranslational folding on the ribosome // *Elife.* 2020. Vol. 9. P. 1–21.
89. Neuweiler H. et al. Measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in peptides at the single-molecule level // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 18. P. 5324–5330.
90. Samatova E. et al. High-efficiency translational bypassing of non-coding nucleotides specified by mRNA structure and nascent peptide // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 5. P. 1–10.
91. Ingolia N.T., Hussmann J.A., Weissman J.S. Ribosome Profiling: Global Views of Translation. 2018. P. 1–20.
92. Ingolia N.T. et al. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. 2012.
93. Ingolia N.T., Hussmann J.A., Weissman J.S. Ribosome profiling: Global views of translation // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. Vol. 11, № 5.
94. Qiao X. et al. High sensitivity analysis of water-soluble, cyanine dye labeled proteins by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *Anal. Chim. Acta.* 2009. Vol. 640, № 1–2. P. 114–120.
95. Fan F. et al. Fluorescent Properties of Cyanine Dyes As a Matter of the Environment // *J. Fluoresc.* 2024. Vol. 34, № 2. P. 925–933.
96. Okamura Y. et al. Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 24. P. 107.

97. Wu Y., Williams R.M. The ATTO 565 Dye and Its Applications in Microscopy // *Molecules*. 2024. Vol. 29, № 17.
98. Jiang C. et al. NBD-based synthetic probes for sensing small molecules and proteins: Design, sensing mechanisms and biological applications // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2021. Vol. 50, № 13. P. 7436–7495.
99. Zhang X. et al. Fluorophores Readily Modifiable for Molecular Probes. 2013.
100. Treibs A., Kreuzer F. -H. Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen // *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1968. Vol. 718, № 1. P. 208–223.
101. Kumar P.P.P., Saxena S., Joshi R. BODIPY Dyes: A New Frontier in Cellular Imaging and Theragnostic Applications // *Colorants*. 2025. Vol. 4, № 2. P. 13.
102. Loudet A., Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties // *Chem. Rev.* 2007. Vol. 107, № 11. P. 4891–4932.
103. Groves B.R. et al. Synthesis and characterisation of the unsubstituted dipyrromethane and 4,4-dichloro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: Improved synthesis and functionalisation of the simplest BODIPY framework // *Chem. Commun.* 2013. Vol. 49, № 8. P. 816–818.
104. Schmitt A. et al. Synthesis of the core compound of the BODIPY dye class: 4,4'-difluoro-4-bora-(3a,4a)-diaza-s-indacene // *J. Fluoresc.* 2009. Vol. 19, № 4. P. 755–758.
105. Yang J. et al. BODIPY derivatives bearing borneol moieties: Enhancing cell membrane permeability for living cell imaging // *Dye. Pigment.* 2019. Vol. 164, № January. P. 105–111.
106. Debnath S. et al. Site-selective synthesis and characterization of BODIPY-acetylene copolymers and their transistor properties // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2016. Vol. 54, № 13. P. 1978–1986.
107. Chapran M. et al. An Ambipolar BODIPY Derivative for a White Exciplex OLED and Cholesteric Liquid Crystal Laser toward Multifunctional Devices // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 5. P. 4750–4757.
108. Bellomo C. et al. Red light-emitting Carborane-BODIPY dyes: Synthesis and properties of visible-light tuned fluorophores with enhanced boron content // *Dye. Pigment.* 2021. Vol. 194, № 1. P. 109644.
109. Debela D.T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives // *SAGE Open Med.* 2021. Vol. 9.
110. Li F.Z. et al. Photophysical properties regulation and applications of BODIPY-based derivatives with electron donor-acceptor system // *Results Chem.* Elsevier B.V., 2022. Vol. 4, № April. P. 100384.
111. Gao D. et al. Molecular engineering of near-infrared light-responsive BODIPY-based nanoparticles with enhanced photothermal and photoacoustic efficiencies for cancer theranostics // *Theranostics*. 2019. Vol. 9, № 18. P. 5315–5331.

112. Fan W. et al. SIRT1 regulates sphingolipid metabolism and neural differentiation of mouse embryonic stem cells through c-Myc- SMPDL3B // *Elife*. 2021. Vol. 10.
113. Shi Z. et al. Bioapplications of small molecule Aza-BODIPY: From rational structural design to: *From vivo investigations* // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2020. Vol. 49, № 21. P. 7533–7567.
114. Nusshold C. et al. Endocytosis and intracellular processing of BODIPY-sphingomyelin by murine CATH.a neurons // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. The Authors, 2013. Vol. 1831, № 12. P. 1665–1678.
115. Qiu B., Simon M.C. *Bodipy Microscopy*. 2017. Vol. 6, № 17. P. 1–6.
116. Walter E.R.H. et al. Mitochondria-targeting biocompatible fluorescent BODIPY probes // *Chem. Sci. Royal Society of Chemistry*, 2024. P. 4846–4852.
117. Farooq A. et al. Exogenous Contrast Agents in Photoacoustic Imaging: An In Vivo Review for Tumor Imaging // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, № 3. P. 1–24.
118. Ni Y. et al. Naphthalene-fused BODIPY near-infrared dye as a stable contrast agent for: *In vivo* photoacoustic imaging // *Chem. Commun. Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 52, № 77. P. 11504–11507.
119. Kamkaew A. et al. BODIPY dyes in photodynamic therapy // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, № 1. P. 77–88.
120. Kim B. et al. In Vitro Photodynamic Studies of a BODIPY-Based Photosensitizer // *European J. Org. Chem.* 2017. Vol. 2017, № 1. P. 25–28.
121. Han H.S., Choi K.Y. Advances in nanomaterial-mediated photothermal cancer therapies: Toward clinical applications // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 3. P. 1–15.
122. Pewklang T. et al. Revolutionary Pyrazole-based Aza-BODIPY: Harnessing Photothermal Power Against Cancer Cells and Bacteria // *ChemBioChem*. 2024. Vol. 25, № 3. P. 1–11.
123. Malouff T.D. et al. Boron Neutron Capture Therapy: A Review of Clinical Applications // *Front. Oncol.* 2021. Vol. 11, № February. P. 1–11.
124. Xuan S. et al. Synthesis and in Vitro Studies of a Series of Carborane-Containing Boron Dipyrromethenes (BODIPYs) // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 5. P. 2109–2117.
125. Liu Y. et al. Triple-BODIPY organic nanoparticles with particular fluorescence emission // *Dye. Pigment*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 147. P. 241–245.
126. Baskin J.M. et al. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 43. P. 16793–16797.
127. Beatty K.E. et al. A BODIPY-cyclooctyne for protein imaging in live cells // *ChemBioChem*. 2011. Vol. 12, № 14. P. 2137–2139.
128. Tuckey C. et al. Protein Synthesis Using a Reconstituted Cell-Free System // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. Vol. 108, № 1. P. 1–7.

129. Volynkina I.A. et al. Hybrid Molecules of Azithromycin with Chloramphenicol and Metronidazole: Synthesis and Study of Antibacterial Properties // Pharmaceuticals. 2024. Vol. 17, № 2. P. 1–22.
130. Osterman I.A. et al. Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. Vol. 56, № 4. P. 1774–1783.
131. Terenin I.M. et al. A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41, № 3. P. 1807–1816.
132. Osterman I.A. et al. 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. Vol. 60, № 12. P. 7481–7489.
133. Kirchdoerfer R.N. et al. Fluorescence-based analysis of aminoacyl- and peptidyl-tRNA by low-pH sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis // Anal. Biochem. 2007. Vol. 364, № 1. P. 92–94.
134. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // Anal. Biochem. 1987. Vol. 166, № 2. P. 368–379.
135. Beckert B. et al. Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics // Nat. Commun. Springer US, 2021. Vol. 12, № 1. P. 4466.
136. Bartetzko A., Nierhaus K.H. Mg²⁺/NH⁴⁺/Polyamine System for Polyuridine-Dependent Polyphenylalanine Synthesis with Near in Vivo Characteristics // Methods Enzymol. 1988. Vol. 164, № C. P. 650–658.
137. Young D.J. et al. The codon specificity of eubacterial release factors is determined by the sequence and size of the recognition loop // Rna. 2010. Vol. 16, № 8. P. 1623–1633.
138. Walter J.D. et al. Thiomodreton inhibits stable 70S ribosome binding and ribosome-dependent GTPase activation of elongation factor G and elongation factor 4. 2012. Vol. 40, № 1. P. 360–370.
139. Makarov G.I., Sumbatyan N. V, Bogdanov A.A. Structural Insight into Interaction between C20 Phenylalanyl Derivative of Tylosin and Ribosomal Tunnel. 2017. Vol. 82, № 8.
140. Korshunova G.A. et al. Peptide Derivatives of Tylosin-Related Macrolides. 2007. Vol. 33, № 2. P. 218–226.
141. van Bambeke F. et al. Mechanisms of Action // Infectious Diseases. Elsevier, 2017. P. 1162–1180.e1.
142. Svidritskiy E. et al. Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Vol. 110, № 30. P. 12283–12288.
143. Semenkov Y. et al. Puromycin reaction for the A site-bound peptidyl-tRNA // FEBS Lett. 1992. Vol. 296, № 2. P. 207–210.

144. Aviner R. The Science of Puromycin : from Studies of Ribosome Function to // *Comput. Struct. Biotechnol. J. Research Network of Computational and Structural Biotechnology*, 2020.
145. Sothiselvam S. et al. Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, № 27. P. 9804–9809.
146. Pérez-González J.A., Vara J., Jiménez A. Acetylation of puromycin by *Streptomyces*, alboniger the producing organism // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. Vol. 113, № 3. P. 772–777.
147. Pestka S. Inhibitors of Ribosome Functions // *Annu. Rev. Microbiol.* 1971. Vol. 25, № 1. P. 487–562.
148. Aviner R. The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology // *Comput. Struct. Biotechnol. J. The Author*, 2020. Vol. 18. P. 1074–1083.
149. Nathans D., Neidle A. Structural requirements for puromycin inhibition of protein synthesis // *Nature*. 1963. Vol. 197, № 4872. P. 1076–1077.
150. Li X.Z., Plésiat P., Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 28, № 2. P. 337–418.
151. CAVALLERI B., TURCONI M., PALLANZA R. Synthesis and antibacterial activity of some derivatives of the antibiotic thermorubin. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1985. Vol. 38, № 12. P. 1752–1760.
152. Johnson F. et al. Thermorubin. 1. Structure Studies // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. Vol. 102, № 17. P. 5580–5585.
153. Lin F.L., Wishnia A. The protein synthesis inhibitor thermorubin. 1. Nature of the thermorubin-ribosome complex // *Biochemistry*. 1982. Vol. 21, № 3. P. 477–483.
154. Lin F.L., Wishnia A. The protein synthesis inhibitor thermorubin. 2. Mechanism of inhibition of initiation on *Escherichia coli* ribosomes // *Biochemistry*. 1982. Vol. 21, № 3. P. 484–491.
155. Bremer E. et al. A model industrial workhorse: *Bacillus subtilis* strain 168 and its genome after a quarter of a century // *Microb. Biotechnol.* 2023. Vol. 16, № 6. P. 1203–1231.
156. Шафиков Р.Р. Структурно - функциональная характеристика лигандов маркера рака простаты GCPII и анализ регуляции экспрессии кодирующего его гена FOLH1 Оглавление. 2022.
157. Huang L. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview // *Antibiotics*. 2022. Vol. 11, № 4. P. 520.
158. Moll I. et al. Translation initiation with 70S ribosomes: An alternative pathway for leaderless mRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 11. P. 3354–3363.
159. Egorova T. et al. Fluorescent toeprinting to study the dynamics of ribosomal complexes // *Methods*. Elsevier, 2019. Vol. 162–163, № June 2019. P. 54–59.
160. Laurberg M. et al. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome // *Nature*. 2008. Vol. 454, № 7206. P. 852–857.

161. Parajuli N.P. et al. Antibiotic thermorubin tethers ribosomal subunits and impedes A-site interactions to perturb protein synthesis in bacteria // *Nat. Commun.* Springer US, 2023. Vol. 14, № 1.
162. Ni Y. et al. Meso-ester and carboxylic acid substituted BODIPYs with far-red and near-infrared emission for bioimaging applications // *Chem. - A Eur. J.* 2014. Vol. 20, № 8. P. 2301–2310.
163. Wang M. et al. Syntheses and Investigations of Conformationally Restricted, Linker-Free α -Amino Acid–BODIPYs via Boron Functionalization // *J. Org. Chem.* 2021. Vol. 86, № 24. P. 18030–18041.

Приложение

Приложение 1

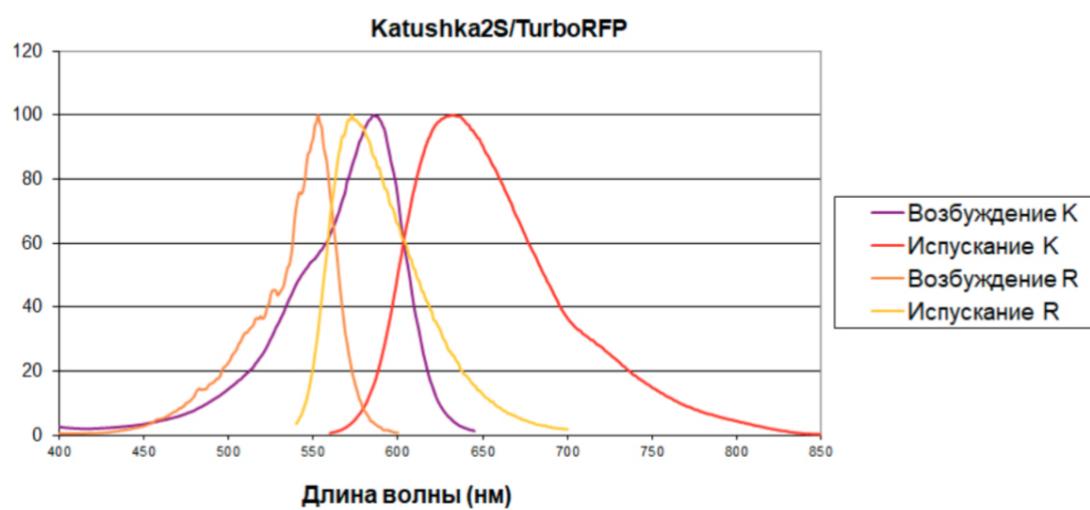


Рис. 63 Спектры возбуждения и испускания для двух красных флуоресцентных белков – RFP и Katushka2S.

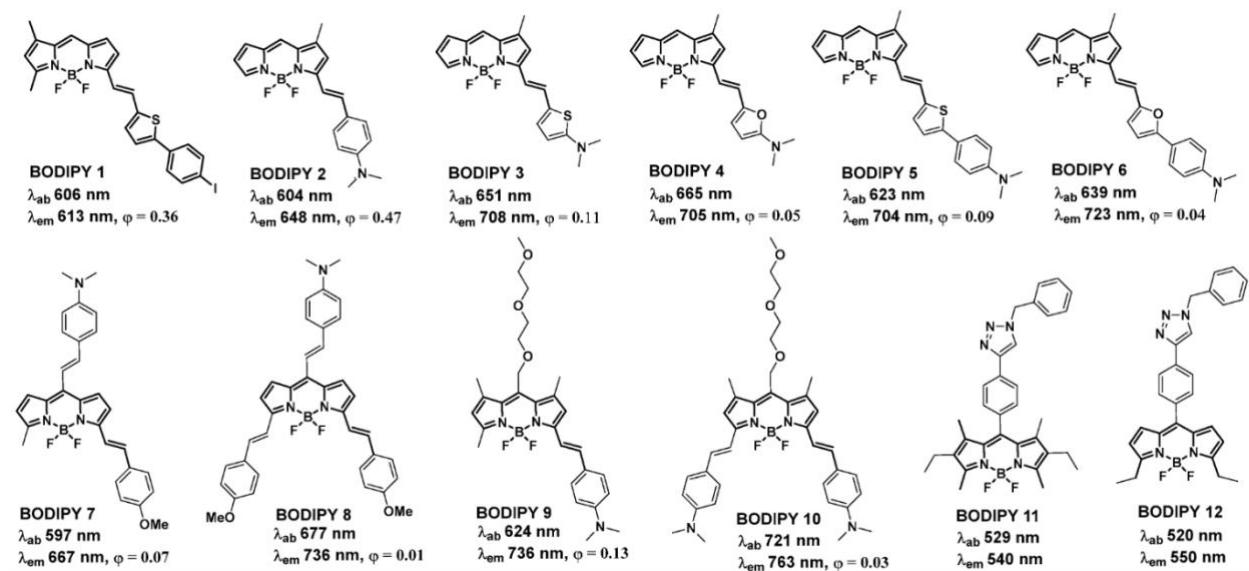


Рис. 64 Вариации BODIPY для мониторинга агрегации и конформационных изменений бета-амилоидов.

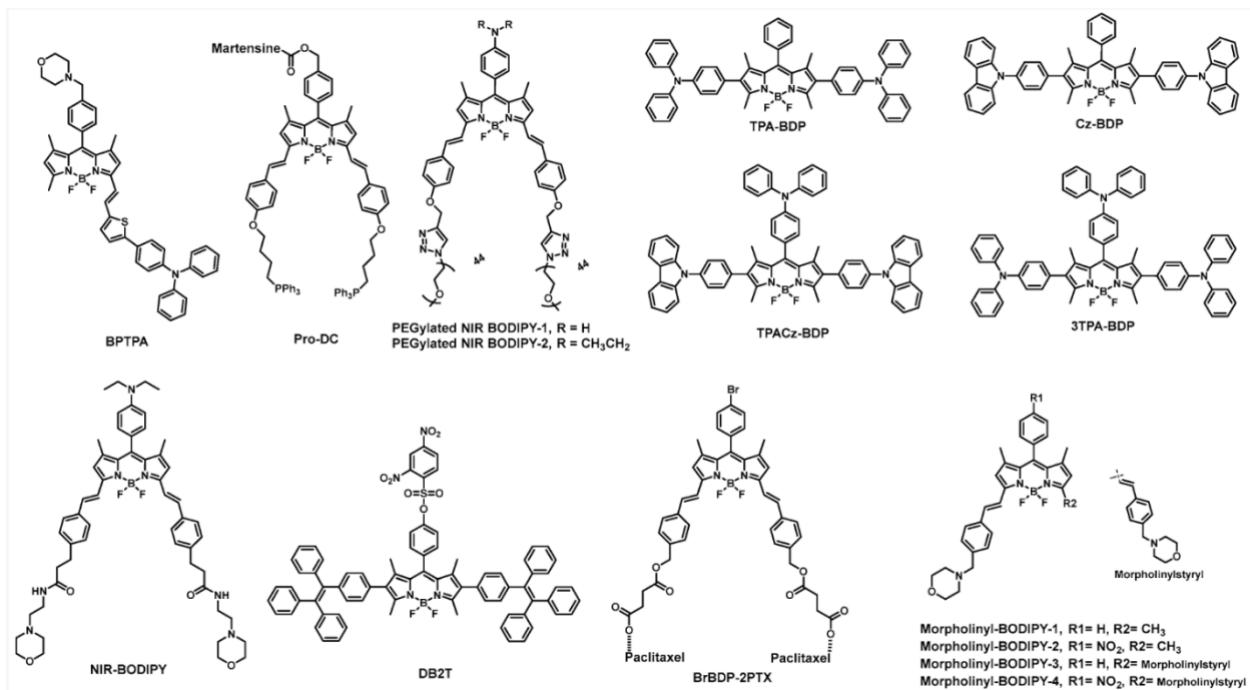


Рис. 65 Вариации BODIPY для выявления рака.

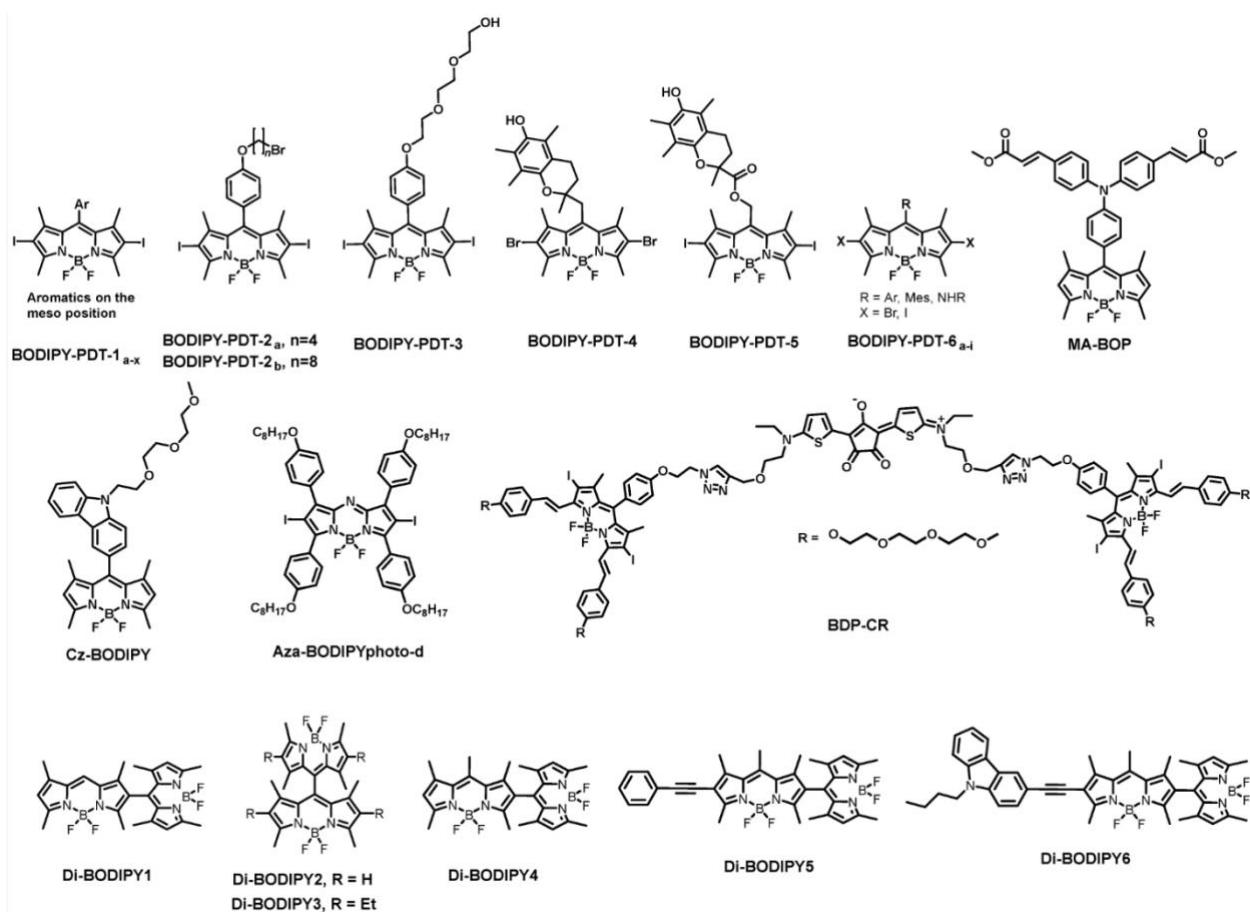


Рис. 66 BODIPY-производные для фотодинамической терапии и фототермической терапии.

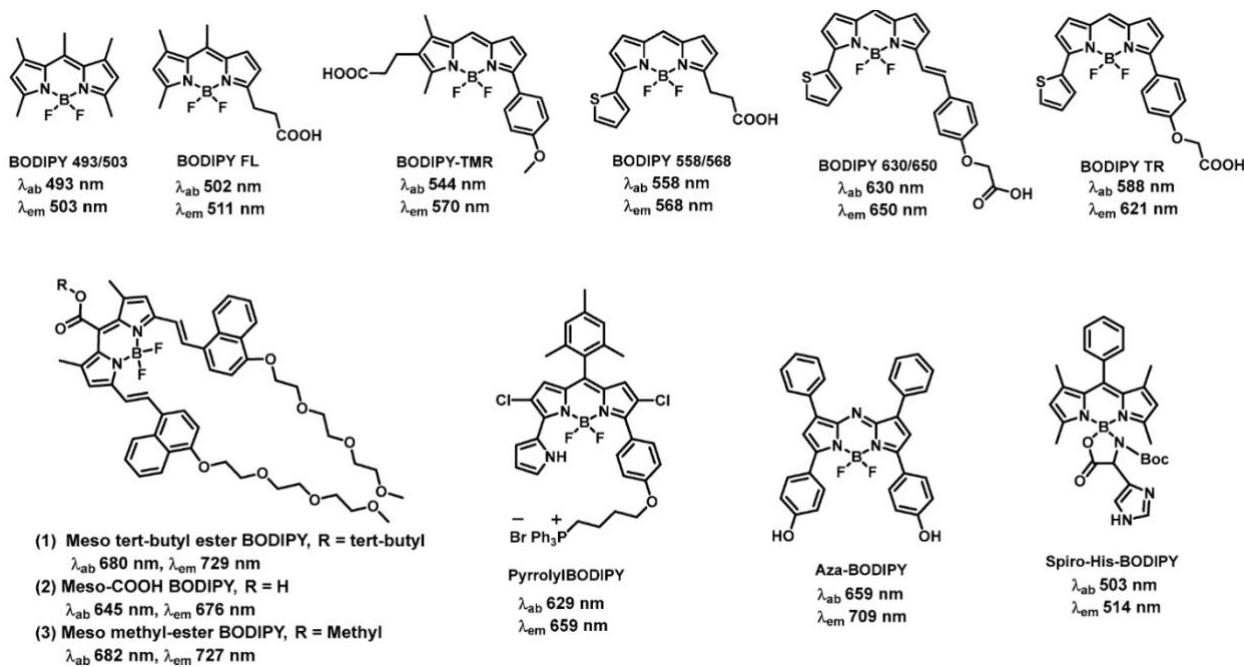


Рис. 67 Разнообразие BODIPY красителей с указанием максимума поглощения и испускания света [162], [163].

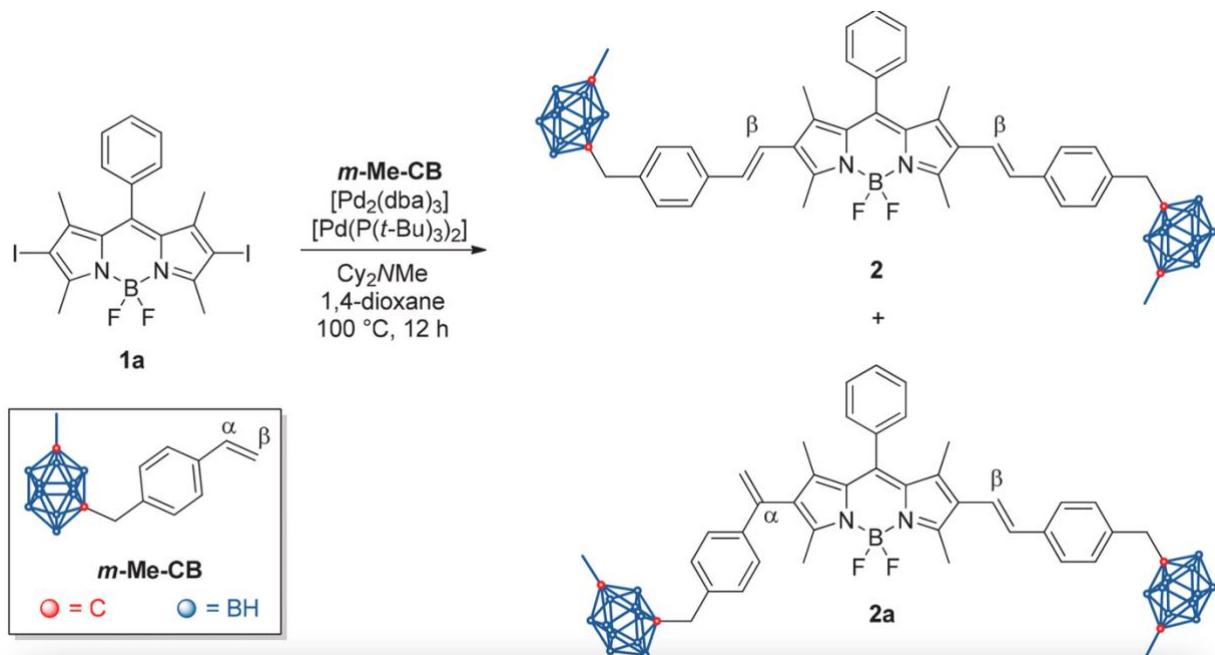


Рис. 68 Получение 2,6-бис(стиренилкарборан)-BODIPY красителей [108].

Приложение 2

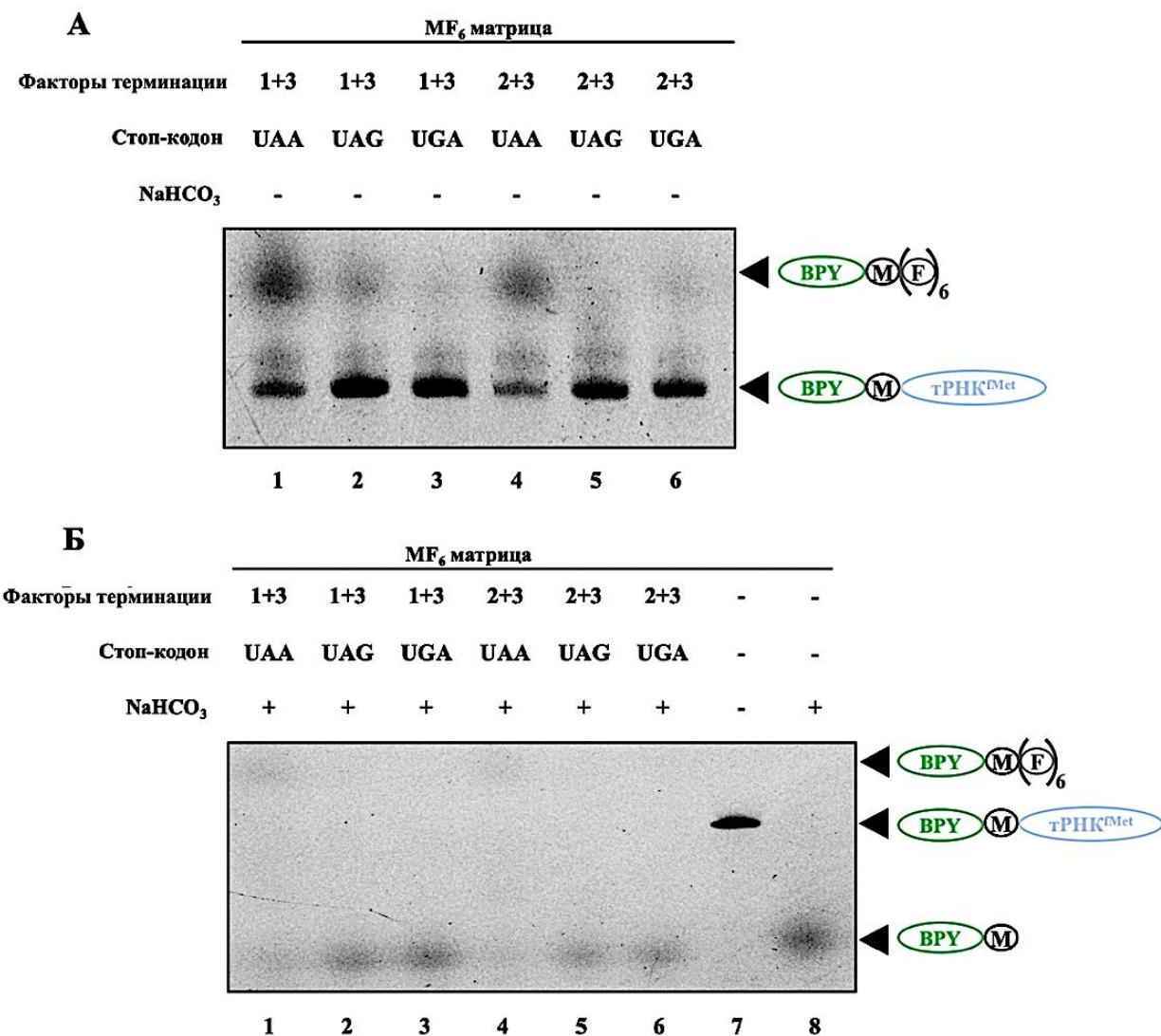


Рис. 69 Оценка эффективности терминации трансляции с помощью электрофореза в РНК ПААГ. ДНК-матрицы, кодирующие MF6-пептиды с различными стоп-кодонами (дорожки 1, 4 — UAA; 2, 5 — UAG; 3, 6 — UGA) были добавлены в транскрипционно-трансляционную систему PURExpress ΔRF123 Kit в присутствии BPY-Met-tPHK^{fMet} с добавлением RFs либо RF1 и RF3 (1–3 дорожки), либо RF2 и RF3 (4–6 дорожки). Исходной BPY-Met-tPHK^{fMet} соответствует дорожка 7 (до гидролиза 1 M NaHCO₃) и 8 (после гидролиза 1 M NaHCO₃). (А) Разделение продуктов трансляции без гидролиза сложноэфирной связи. (Б) Разделение продуктов трансляции после гидролиза 1 M NaHCO₃. BPY отмечен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — tPHK^{fMet}.

Table I. Antibacterial activities *in vitro* of cystocin, puromycin and ciprofloxacin

Organism	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	Cystocine	Puromycin	Ciprofloxacin
<i>Streptococcus pyogenes</i> 308A	3.125	6.250	3.125
<i>Streptococcus pyogenes</i> 77A	3.125	6.250	0.391
<i>Streptococcus faecium</i> MD8b	6.250	6.250	0.391
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	6.250	6.250	0.195
<i>Staphylococcus aureus</i> 285	6.250	12.50	0.781
<i>Staphylococcus aureus</i> 503	6.250	6.250	0.391
<i>Escherichia coli</i> 0786.250	12.50	25.00	0.004
<i>Escherichia coli</i> DC0	50.00	100.0	0.195
<i>Escherichia coli</i> DC2	1.563	1.563	0.098
<i>Escherichia coli</i> TEM	50.00	>100	0.013
<i>Escherichia coli</i> 1507 E	50.00	>100	0.013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	>100	>100	0.195
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1592E	>100	>100	0.195
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771	>100	>100	0.195
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	25.00	100.0	0.049
<i>Salmonella typhimurium</i>	25.00	50.00	0.007
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082E	3.125	3.125	<0.002
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E	100.0	100.0	0.013
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	50.00	>100	0.013
<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E	25.00	25.00	0.004

Таблица 12. Измеренные значения МИК для цистоцина, пуромицина и ципрофлоксацина на 20 штаммах бактерий [8].

Table II. Antitumor activities *in vitro* of cystocin, puromycin and doxorubicin

Compounds	IC_{50} (μ g/mL)				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT-15
Cystocin	0.14	0.10	0.11	0.13	0.14
Puromycin	0.31	0.38	0.16	0.28	1.08
Doxorubicin	0.01	0.038	0.107	0.098	0.091

Таблица 13. Значение IC_{50} для пуромицина, цистоцина и доксорубицина 5 клеточных линий человека. A549 (немелкоклеточный рак лёгкого человека), SK-OV-3 (яичник человека), SK-MEL-2 (меланома человека), XF-498 (центральная нервная система человека) и HCT-15 (толстая кишка человека) [8]. Цитотоксичность цистоцина в два-девять раз выше, чем у пуромицина.

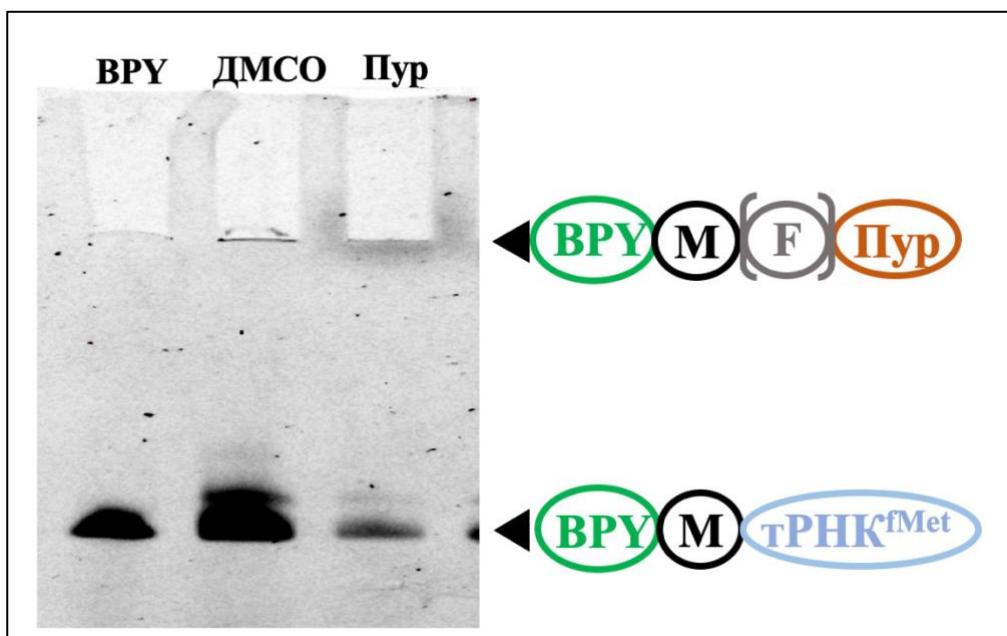


Рис. 70 Сопряженная транскрипция-трансляция в системе из очищенных компонентов PURExpress® Δ RF123 Kit с использованием MF2 ДНК-матрицы в присутствии исходной BPY-Met-tRNA^{fMet} и пуромицина (Пур). Дорожка «БPY» соответствует исходной BPY-Met-tRNA^{fMet}. BPY обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионин (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); оранжевым овалом — пуромицин (Пур), синим овалом — tRNA^{fMet}.

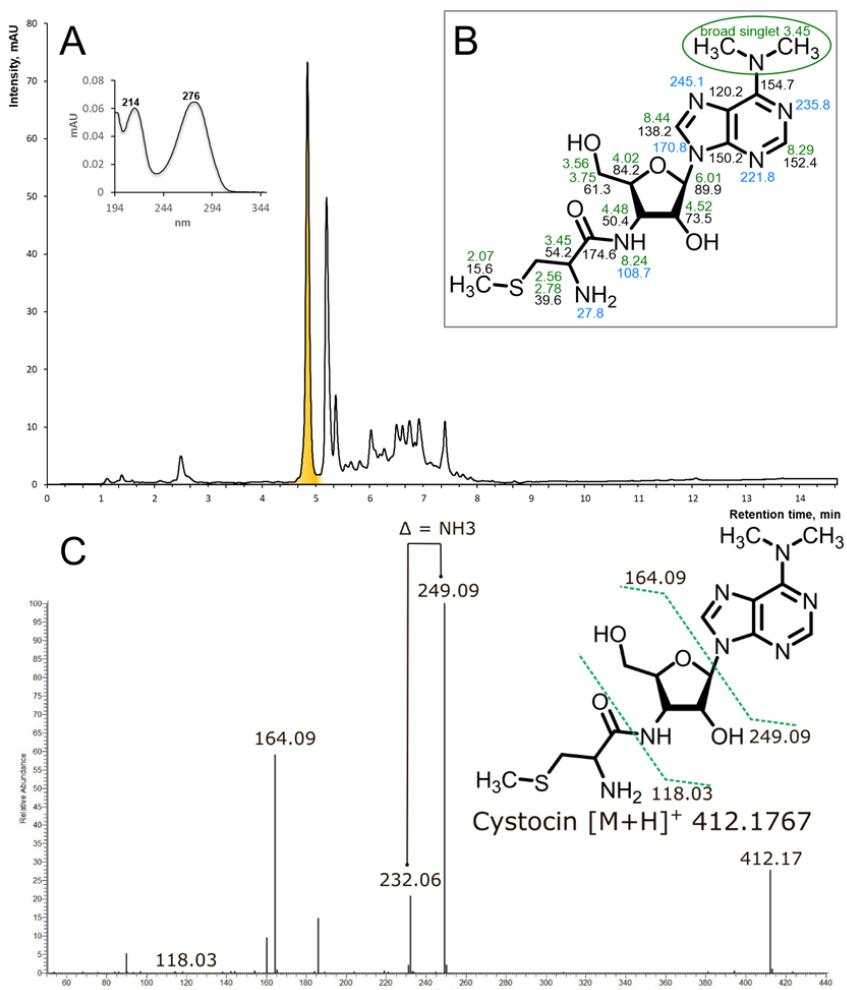
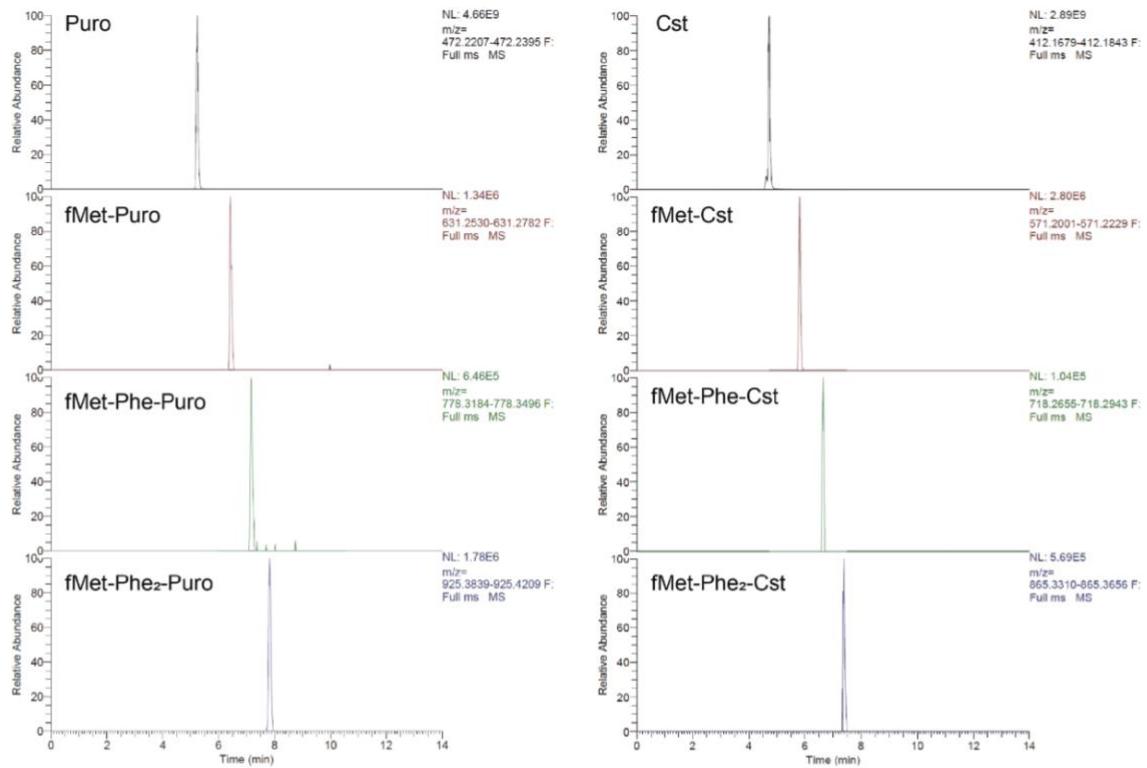


Рис. 71 (А) rp-HPLC активной фракции (Agilent HC-C18(2) 4,6 × 150 мм, 5 мкм) Активный компонент (выделен желтым цветом) имеет максимумы УФ-излучения при 214 и 276 нм. Масс-спектрометрический анализ выявил ион $[M+H]^+$ с точной массой 412,1767 Да, соответствующий молекулярной формуле $C_{16}H_{25}N_7O_4S$ - цистеинил-содержащий аналог пуромицина. (В) Структура цистоцина с указанием химических сдвигов ЯМР (указано в м.д.) в ^{29}Si -д6 при 35 °С. Зеленые цифры обозначают химические сдвиги 1H , черные — ^{13}C и синие — ^{15}N . (С) Масс-спектры цистоцина в положительном режиме фрагментация HCD и предполагаемая фрагментация родительского иона показала преобладающие фрагментные ионы при m/z 249,09 и 164,09 из-за потери N,N-диметиладенозина, а ион m/z 118,03 был назначен как S-метилцистеиновая часть (в сотрудничестве с научной группой Алферовой В.А.).



	Molecular formula	[M+H] ⁺ calc	[M+H] ⁺ found
Puro	C22H29N7O5	472.2301	472.2317
fMet-Puro	C28H38N8O7S	631.2656	631.2671
fMet-Phe-Puro	C37H47N9O8S	778.334	778.3362
fMet-Phe2-Puro	C46H56N10O9S	925.4024	925.4082
fMet-Phe3-Puro	C55H65N11O10S	1072.471	-
<hr/>			
Cst	C16H25N7O4S	412.1770	412.1790
fMet-Cst	C22H34N8O6S2	571.2121	571.2125
fMet-Phe-Cst	C31H43N9O7S2	718.2805	718.2820
fMet-Phe2-Cst	C40H52N10O8S2	865.3489	865.3502
fMet-Phe3-Cst	C49H61N11O9S2	1012.417	-

Рис. 72 LC-MS анализ цистоцин- и пуромицин-укороченных пептидов. Cst – цистоцин, Puro – пуромицин.

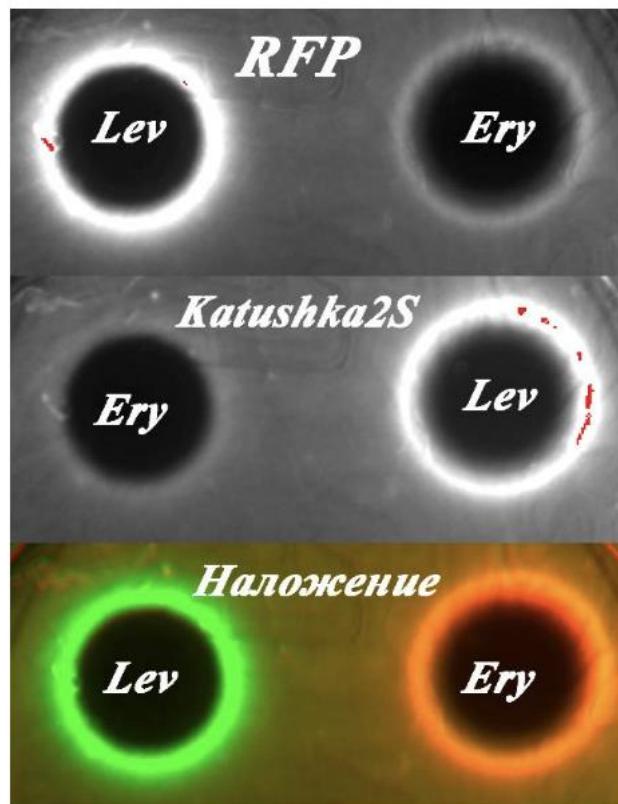


Рис. 73 Индукция репортерной системы DualRep2 двумя контрольными антибиотиками - эритромицином (Ery) и левофлоксацином (Lev). Сканирование агаризованных чашек Петри после 18 часов на 37°C инкубации проводили сканером флуоресценции ChemiDoc® BIORAD в каналах Су3 и Су5. Две черно-белые фотографии накладывались друг на друга с присвоением цветов: для индукции от RFP - зеленый цвет, а для Katushka2S – красный.

Приложение 3

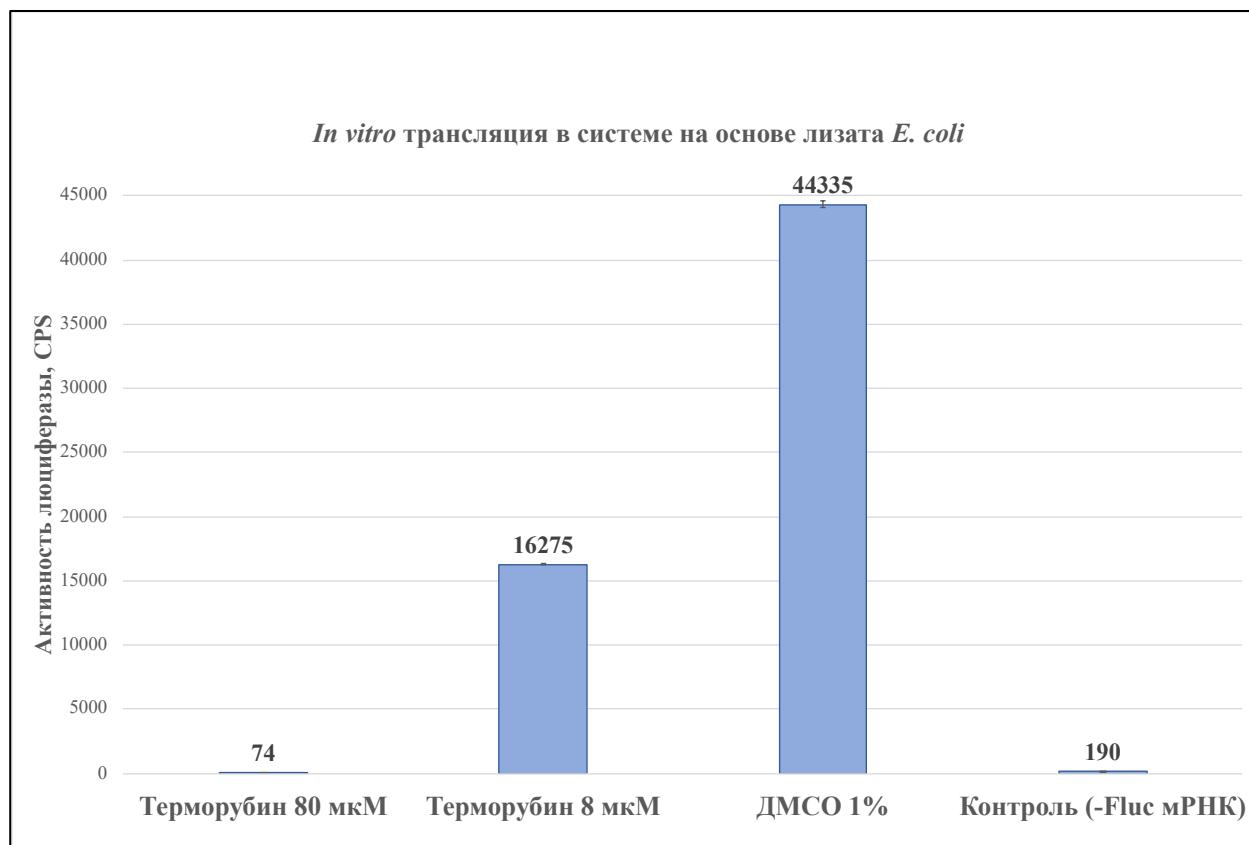


Рис. 74 *In vitro* трансляция в прокариотической системе на основе лизата *E. coli* для терморубина (80 и 8 мкM). Контрольные реакции – 1 % ДМСО (отрицательный контроль) и положительный контроль – реакция без добавления мРНК матрицы Fluc.

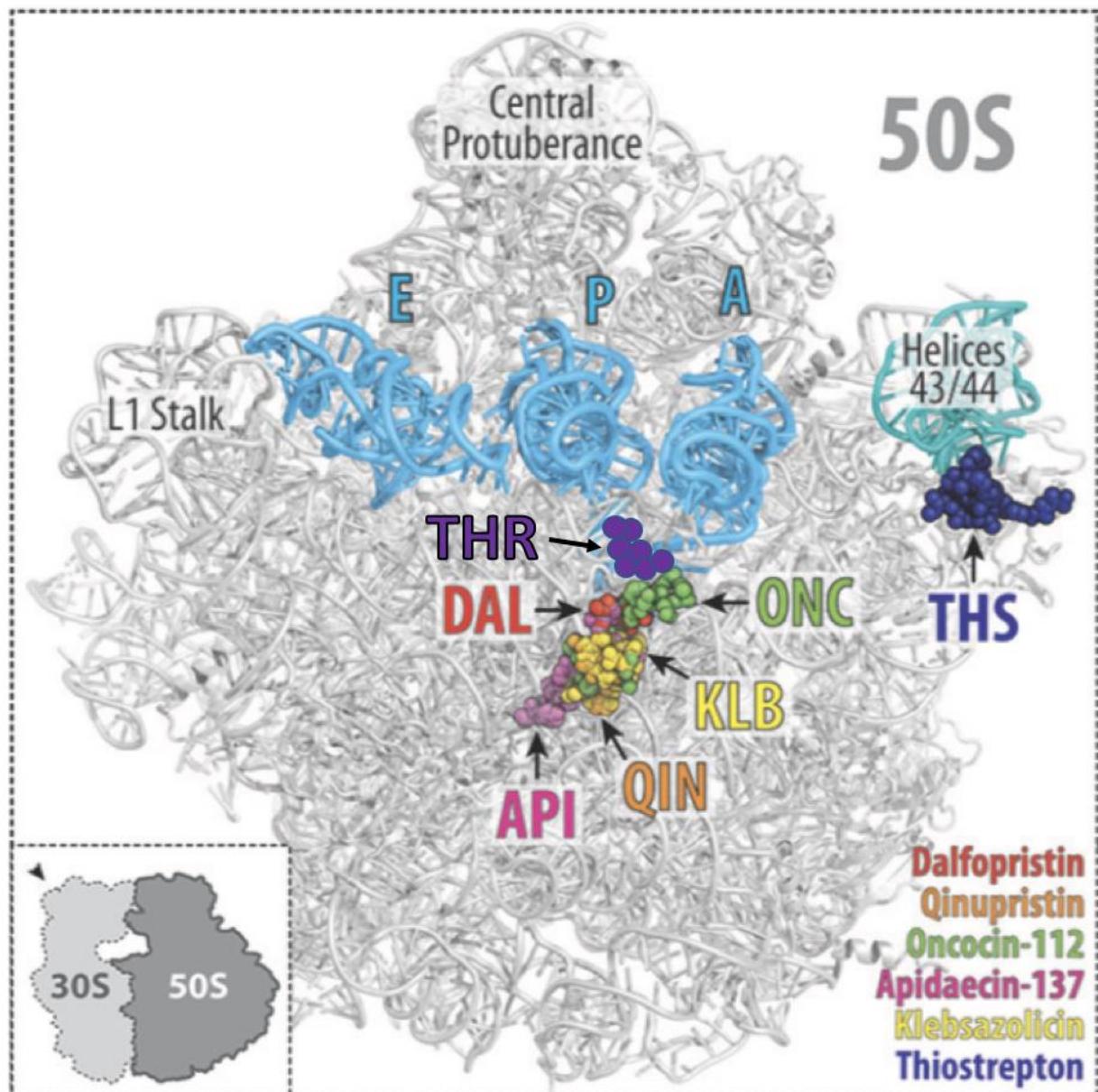


Рис. 75 Строение 50S рибосомной субъединицы с указанием основных сайтов-связывания для различных антибиотиков. Синим обозначено место связывания тиострептона (THS), фиолетовым – место связывания терморубина (THR).

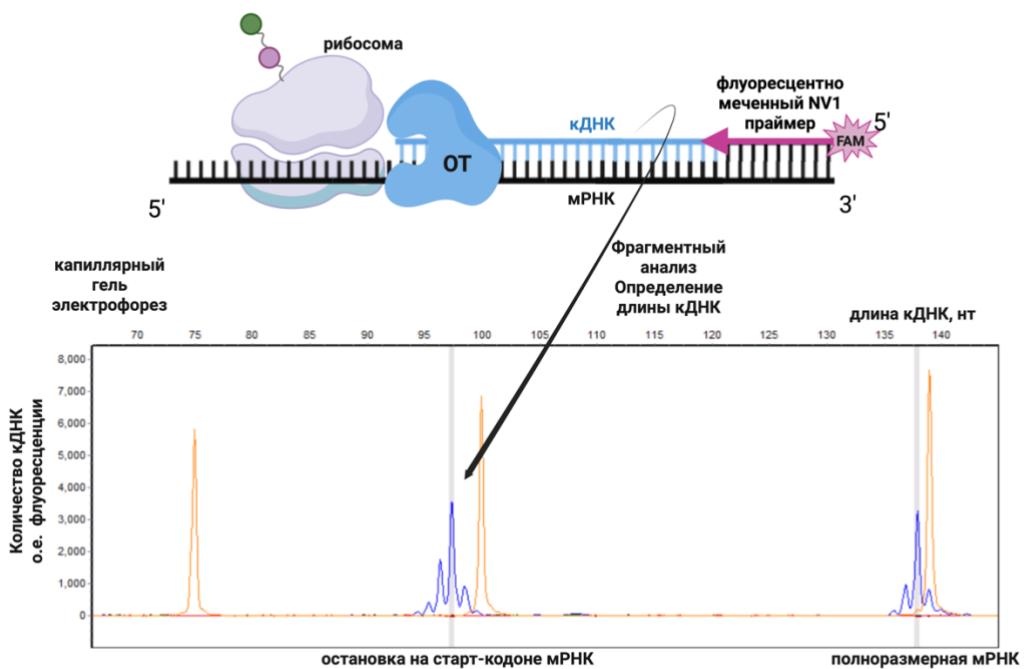


Рис. 76 Принципиальная схема флуоресцентного toe-print анализа. Вместе изотопно-меченного праймера, используется флуоресцентно меченный (метка FAM). Методика проведения эксперимента аналогична изотопному toe-print анализу, за исключением детекции образцов: образцы отдают на фрагментный анализ (в ЦКП геном), где образцы подвергаются разделению по длинам с помощью капиллярного гель-электрофореза. Длину полученных фрагментов анализируют в программе GeneMarker.

MKFAITLR**QCEGWSP**V**HYDN* (RST2)**

ML**VFQMRNV**D**KTSTIL**K*** (ErmB)**

MH**SKYIWVL**R**QPNMKGFEDCTA* (RST3)**

MI**SLIAALAVDRVIGMENA...T... (DHFR)**

Рис. 77 Паттерн остановок рибосом под воздействием терморубина на различных матрицах, выявленный флуоресцентным toe-print анализом. Кодоны, на которых происходила остановка рибосом, соответствуют аминокислотам, выделенным зеленым цветом. Размер выделенных букв прямо пропорционален величине сигнала от остановки рибосом.



Рис. 78 Дизайн библиотеки мРНК. Красной стрелкой показан Т7 промотор; голубыми прямоугольниками – 5'- и 3'-НТО, зеленый прямоугольник соответствует старт-кодону – АУГ; красный прямоугольник – стоп-кодону УАА. Разноцветные прямоугольники – randomизированные кодоны и уникальные последовательности (баркоды) в 3'НТО.

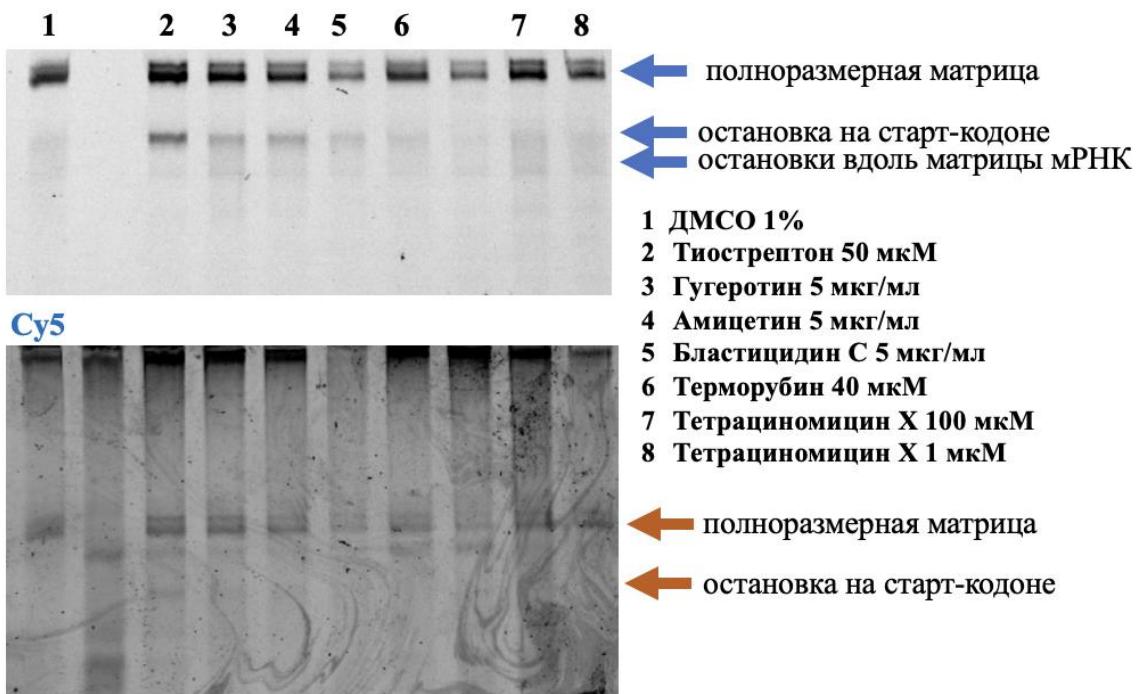


Рис. 79 Toe-seq анализ с использованием рандомизированных матрицах для различных антибиотиков, включая терморубин (дорожка 6). Верхняя картинка – сканирование после toe-print анализа геля в канале Су5, нижняя – сканирование после окрашивания SybrGreen II.