

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Марина Валерия Ивановна

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

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени кандидата
химических наук

Москва — 2025

Диссертация подготовлена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Научные руководители – **Сергиев Пётр Владимирович**
доктор химических наук, член-корреспондент
РАН

Лукьянов Дмитрий Александрович
кандидат химических наук

**Официальные
оппоненты**

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

Грайфер Дмитрий Маратович – доктор
химических наук, доцент, ведущий научный
сотрудник лаборатории структуры и функции
рибосом Института химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского
отделения РАН

Бизяев Никита Сергеевич – кандидат
биологических наук, младший научный
сотрудник лаборатории механизмов и
контроля трансляции Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится «25» ноября 2025 г. в 18 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы д.1, стр.40, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3601>

Автореферат разослан «___» _____ 202_ г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета, кандидат
химических наук

Агапкина Ю.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Сам же термин «антибиотик» был введен Ваксманом в 1947 году и обозначал «химическое вещество, продуцируемое микроорганизмами, способное уничтожать или подавлять рост бактериальных клеток». 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).

Несмотря на большое разнообразие применяемых антибиотических веществ, перед человечеством стоит большая проблема: развитие устойчивости бактерий к лекарствам (резистентности). По данным Всемирной Организации Здравоохранения, смертность от бактериальных инфекций к 2050 году вырастет в 10 раз и достигнет 10 миллионов в год. Поэтому, поиск новых антибактериальных веществ, а также понимание механизма их действия (для разработки и использования в фармации) является крайне актуальной задачей.

Цель и задачи исследования

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

Для ее достижения были 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 и предмет исследования

Объектами данного исследования являются природные антибиотики цистосин, выделенный из *Streptomyces sp.* Ac-502, терморубин, полученный из *Thermoactinomyces antibioticus*, а также трансляционный аппарат бактерий. Предметом исследования данной работы являются механизмы действия терморубина и цистоцина, анализ структуры их взаимодействия с рибосомой и 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, был выделен, описанный ранее, малоизученный антибиотик – цистоцин – из нового продуцента *Streptomyces sp.* Ac-502 (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Впервые было показано, что по механизму действия цистоцин подобен ближайшему структурному родственнику – пурамицину.

Кроме того, в данной работе детально описан механизм действия антибиотика терморубина, открытого в 1964 году. Ранее считалось, что терморубин является ингибитором инициации трансляции, однако в данной работе это утверждение 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 были получены кинетические данные, подтвержденные *in vitro* экспериментами, демонстрирующие влияние терморубина 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 BODIPY-меченные пептиды с разрешением до 1 аминокислоты 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 – цистодина 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 цистодина - *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 цистостина 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.

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

В сотрудничестве с научной группой В. А. Алферовой были произведены ВЭЖХ, LC-MS, МИКи и ЯМР анализы для цистостина; 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. Цистостин, подобно пурамицину, способствует абортированию трансляции за счет переноса на себя растущей полипептидной цепочки.
3. Терморубин ингибирует 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 Международной конференции ПОСТГЕНОМ'2024 и XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ, 2024.
2. Школа-конференция для молодых ученых «Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним», 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.

Личный вклад автора

В работе [1], [2] и [3] автор принимал участие в разработке, планировании и выполнении экспериментов, анализе данных, подготовке текста к публикации. В работе [4] 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 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»). 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Часть 1. Создание BODIPY-системы

Результаты по данному разделу были опубликованы [1], [2].

На сегодняшний день существует несколько методов, позволяющих определять механизм действия антибиотиков, подавляющих биосинтез белка. Однако, каждый из этих методов имеет ряд ограничений (дороговизна используемых реагентов и оборудования, длительность получения результатов, небезопасность реагентов (например, использование изотопно-меченных праймеров (^{32}P) в toe-print анализе) или невозможность определения точной стадии, на которую влияет антибиотик (отличить пептидилтрансферазную реакцию от транслокации). Поэтому одной из первых задач являлась разработка простой и недорогой системы, которую могут использовать большинство научных лабораторий - с одной стороны, а с другой – создать метод, с помощью которого можно однозначно выявить этап биосинтеза белка, на который оказывается воздействие (инициация трансляции, пептидилтрансферазная реакция, транслокация или терминация трансляции).

1. Используя (меченную BODIPY инициаторную тРНК^{fMet}) ВРҮ-Met-тРНК^{fMet} (рисунок 1), ДНК матрицы: М матрица – кодирует только метионин (AUGUAA), MF (кодирует метионин и фенилаланин) (AUGUUGUAA), MF2 (кодирует метионин и два фенилаланина) (AUGUUGUUGUAA) и т.д., а также коммерческие наборы для сопряженной транскрипции-трансляции, в денатурирующем РНК ПААГ с 7М мочевиной возможно визуализировать короткие (до 7–8) аминокислот) BODIPY-меченные пептиды с разрешением до 1 аминокислоты (рисунок 2).

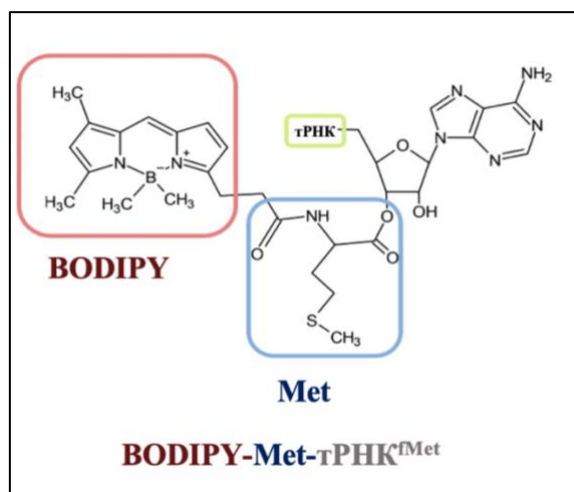


Рисунок 1. Схема строения инициаторной ВРҮ-Met-тРНК^{fMet} (ВРҮ-Met-тРНК^{fMet} была любезно предоставлена научной группой А. Л. Коневеги).

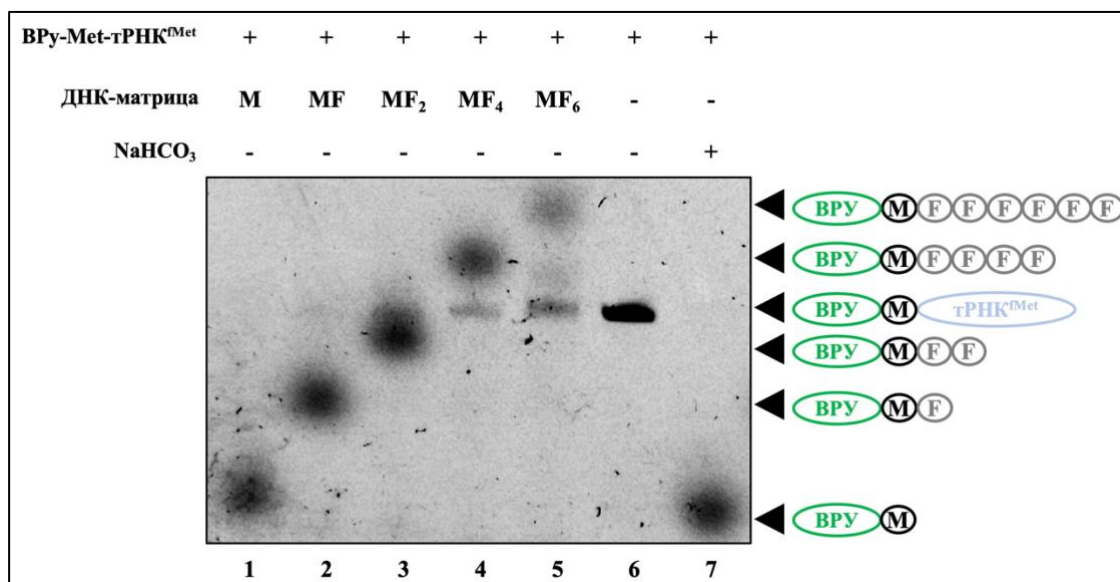


Рисунок 2. Визуализация синтезированных полноразмерных пептидов, меченных BODIPY, в системе для сопряженной транскрипции-трансляции с использованием ДНК-матриц. Продукты синтеза обозначены стрелками. Исходный ВРУ-Met-тРНК^{fMet} соответствует дорожке 6, а дорожка 7 содержит ВРУ-Met, образующийся после гидролиза эфирной связи с помощью 1 М NaHCO₃. Дорожки 1–5 соответствуют продуктам трансляции: M, MF, MF₂, MF₄ и MF₆. ВРУ обозначен зеленым овалом – метка BODIPY; черным кружком – остаток метионина (M); серыми кружками – остатки фенилаланина (F); синим овалом – тРНК^{fMet}.

Благодаря аномальной подвижности BODIPY-меченных пептидов оказалось возможным их разделение с помощью обычного РНК гель-электрофореза.

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.

2. Разработанная BODIPY-система позволяет использовать матрицы, кодирующие не только незаряженные аминокислоты, такие как фенилаланин или лейцин/валин (рисунки 3, А, В), но и даже положительно заряженные – например, лизин (рисунок 3, В).

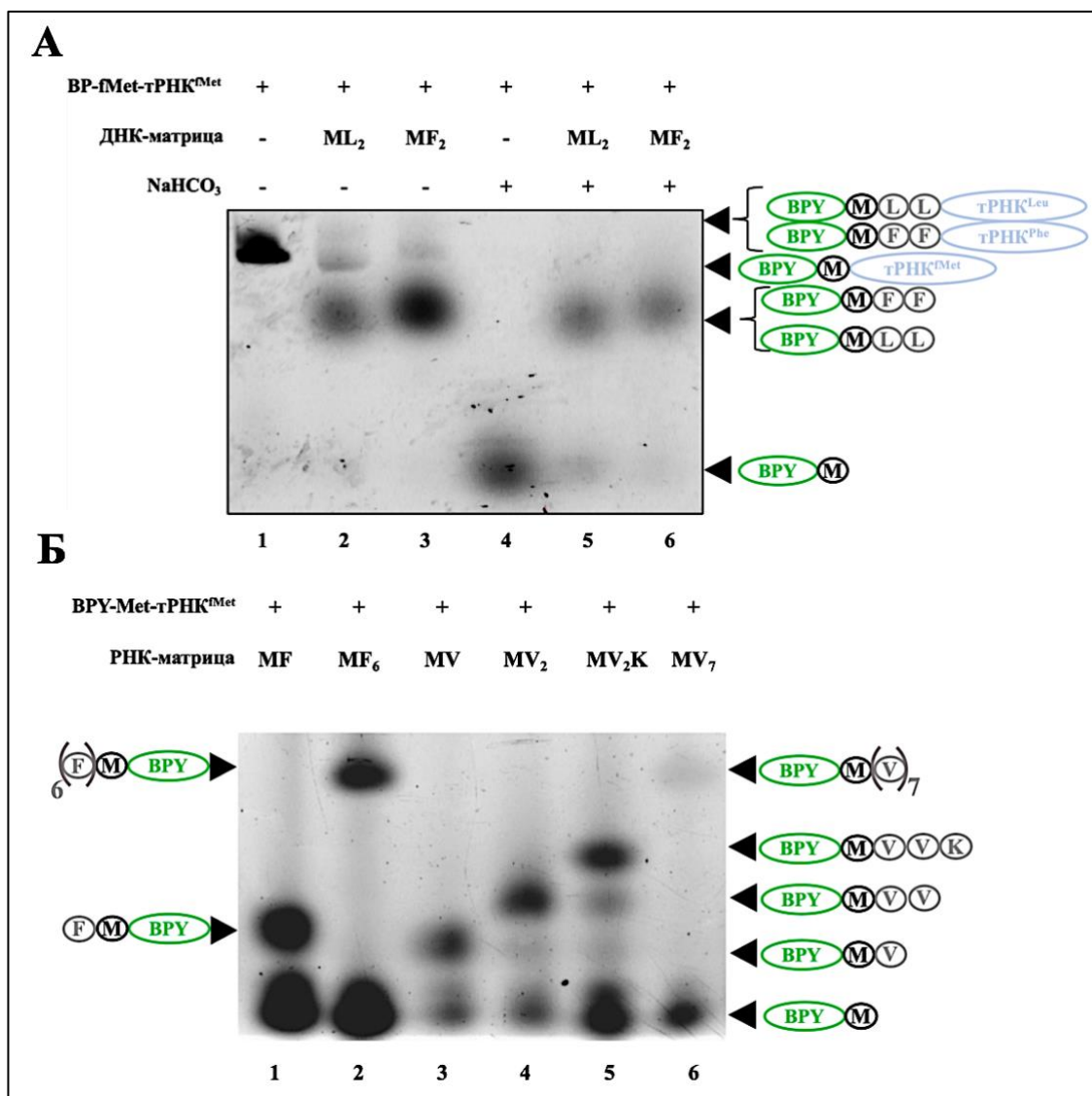


Рисунок 3. Сравнение электрофоретических подвижностей BODIPY-меченных пептидов, содержащих отличные от фенилаланина аминокислоты. (А) Сравнение ВР-Мет-тРНК^{Met} (до гидролиза (2) и после гидролиза сложноэфирной связи (5) дорожки 1М NaHCO₃) с ВР-Мет-тРНК^{Met} (до гидролиза (3) и после гидролиза сложноэфирной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

Было показано, что введение одной положительно заряженной аминокислоты не приводит к отклонению подвижности BODIPY-меченных пептидов, что указывает на широкую применимость и доступность разработанной системы.

3. Метод позволяет изучать терминацию трансляции: влияние антибиотиков на данный процесс и отслеживать высвобождение трансляционных продуктов. Так, используя ДНК-матрицу, кодирующую MF пептид 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 + RF3 или RF2 + RF3), была показана возможность образования полноразмерного продукта синтеза на геле (рисунок 4). Для высвобождения продуктов использовались либо факторы терминации трансляции либо слабощелочной агент 1 М NaHCO_3 , который способствовал гидролизу пептидил-тРНК сложноэфирной связи.

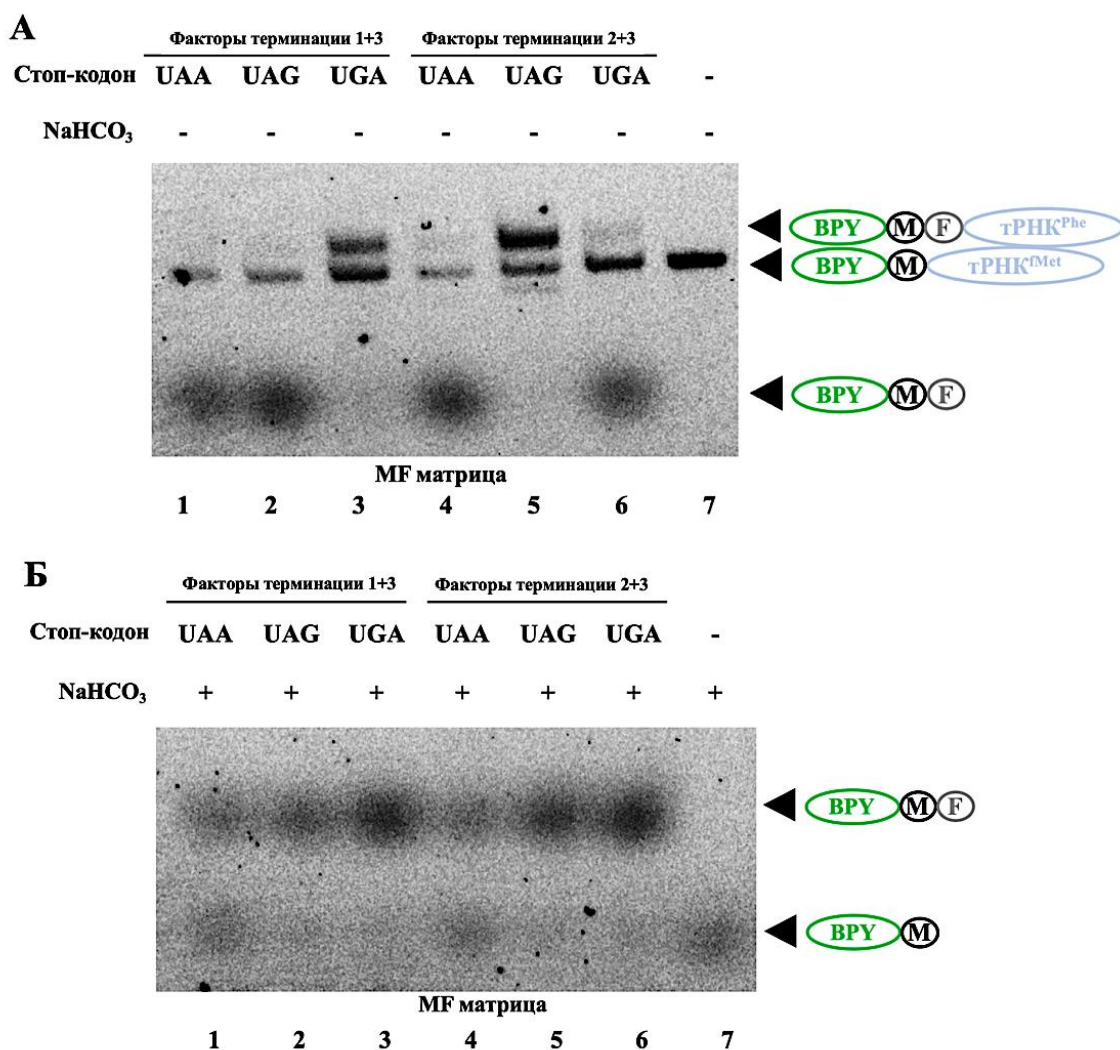


Рисунок 4. Оценка эффективности терминации трансляции с помощью электрофореза в РНК ПААГ. ДНК-матрицы, кодирующие MF-пептиды с различными стоп-кодонами (дорожки 1, 4 — UAA; 2, 5 — UAG; 3, 6 — UGA) были добавлены в транскрипционно-трансляционную систему PURExpress Δ RF123 Kit в присутствии BPY-Met-тРНК^{fMet} с добавлением (RF) либо (RF1 и RF3) (1–3 дорожки), либо (RF2 и RF3) (4–6 дорожки). Исходной BPY-Met-тРНК^{fMet} соответствует дорожка 7. (А) Разделение продуктов трансляции без гидролиза сложноэфирной связи 1 М NaHCO_3 . (Б) Разделение продуктов

трансляции после гидролиза 1 М NaHCO₃. ВРУ отмечен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (М); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — тРНК^{fMet} или тРНК^{Phe}.

Правильная комбинация факторов терминации со стоп-кодом приводит к высвобождению продуктов трансляции (дорожки 1, 2, 4, 6), в ином случае происходит образование продукта, связанного с тРНК (дорожки 3 и 5, самые верхние полосы).

4. Наиболее значимым приложением данного метода является возможность определения механизма действия ингибиторов биосинтеза белка (как известных, так и потенциально новых), способных блокировать этапы инициации трансляции, пептидилтрансферазной реакции, транслокации или терминации трансляции (рисунок 5).

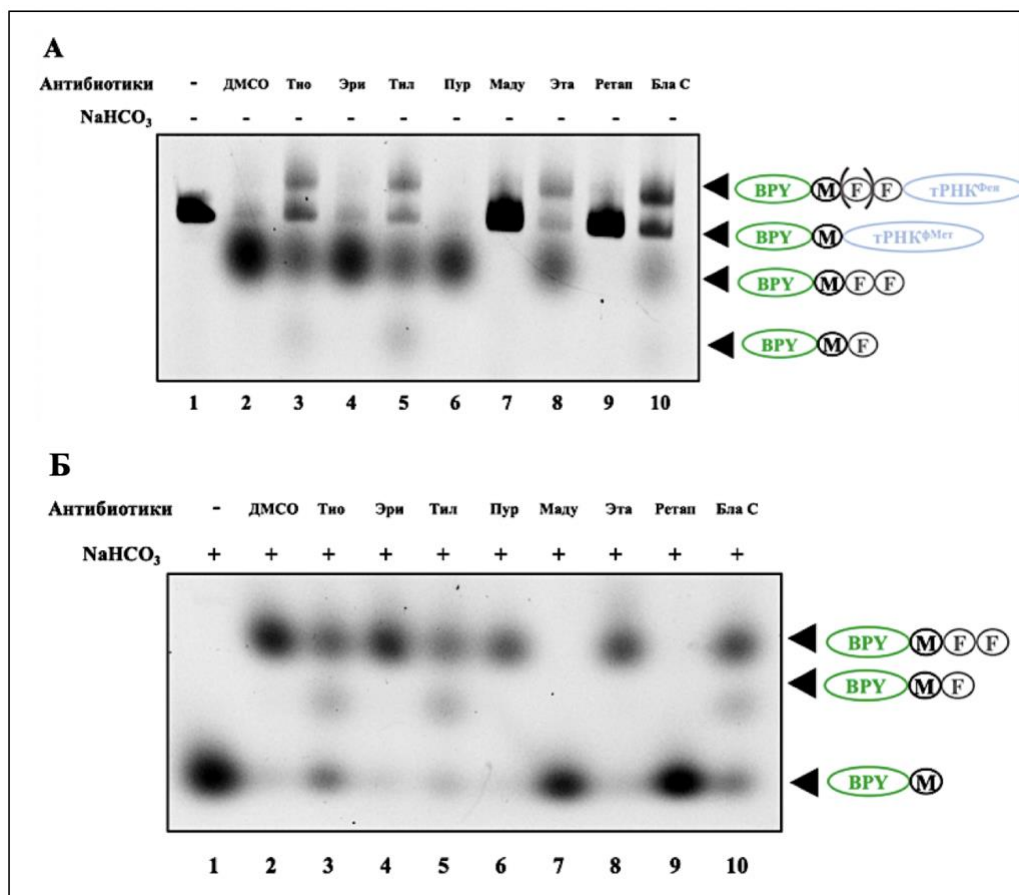


Рисунок 5. Изучение механизма действия антибиотиков с помощью BODIPY-системы. Продукты *in vitro* трансляции мРНК (с ДНК-матрицы), кодирующей MF2, в присутствии исходной ВРУ-Met-тРНК^{fMet} и антибиотиков обозначены черными стрелками (использован PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit (NEB)). (А) Разделение продуктов трансляции до гидролиза сложноэфирной связи. (Б) Разделение продуктов трансляции после гидролиза 1 М NaHCO₃. Дорожка 1 соответствует исходной ВРУ-Met-тРНК^{fMet}. Отрицательный контроль – 1% ДМСО без антибиотика представлен на дорожке 2. Антибиотики: тиострептон (Тио), эритромицин (Эри), тилозин (Тил),

пурамицин (Пур), мадумицин (Маду), этамицин А (Эта), ретапамулин (Ретап) и бластицидин С (Бла С) представлены на дорожках 3–10, соответственно. ВРҮ обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (М); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — тРНК^{fMet} или тРНК^{Phe}.

Отрицательный контроль – 1% ДМСО (2 дорожка) – не оказывает влияния на трансляцию, поэтому на геле визуализируется полноразмерный продукт – MF2, аналогично в случае макролидного антибиотика – эритромицина (дорожка 4) – поскольку на MF2-кодируемой матрице отсутствует специфический мотив RLR, необходимый для останова рибосом. Для тиострептона (дорожка 3), тилозина (дорожка 5) и бластицидина С (дорожка 10) заметны продукты MF/MF2 связанные с тРНК^{Phe}, которые после гидролиза эфирной связи дают отчетливо заметный промежуточный продукт MF, что указывает на ингибирование процесса элонгации данными антибиотиками. Для бластицидина С подтверждено влияние на терминацию трансляции, так как количество MF2 продукта после гидролиза заметно увеличивается (дорожка 10, В). Ретапамулин (дорожка 9) и мадумицин (дорожка 7) – ингибиторы первой пептидной связи, поэтому трансляция полностью подавляется и на геле визуализируется только исходная ВРҮ-Met-тРНК^{fMet}.

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 влияния различных ингибиторов на каждый этап биосинтеза белка по отдельности.

Часть 2. Цистоцин

Результаты по данному разделу были опубликованы [3].

В начале 2000-х годов был открыт антибиотик нуклеозидного класса – цистоцин, выделенный из *Streptomyces sp.* GCA0001, структурно похожий на пурамицин (разница в замене концевой метилтирозина на метилцистеин), но с не охарактеризованным механизмом действий (рисунк 6).

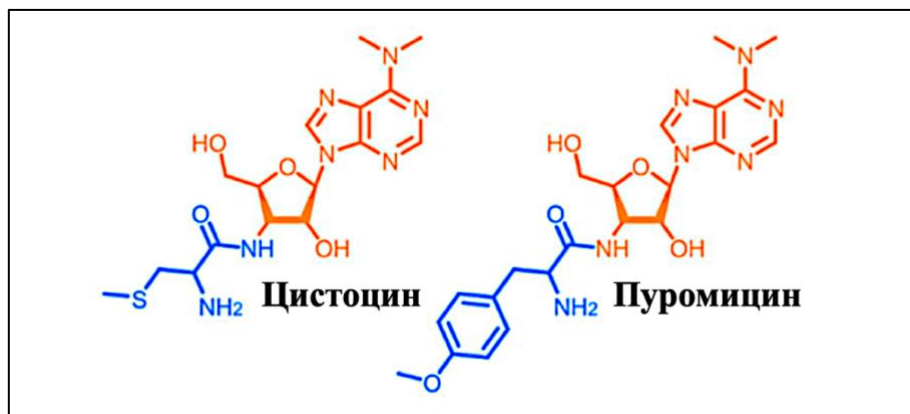


Рисунок 6. Структура цистостатина и пурамицина. Оранжевым цветом обозначена общая структурная часть, синим цветом – остаток метилтирозина (в случае пурамицина) или метилцистеина (в случае цистостатина).

В данной работе был найден и охарактеризован новый продуцент цистостатина – *Streptomyces sp.* Ac-502 (предоставленный Всероссийской коллекцией микроорганизмов). Штамм был культивирован при 28°C в среде LB в течение 4 дней, а после пересева в аналогичных условиях еще 6 дней. Далее с помощью ВЭЖХ, масс-спектрометрического анализа и ЯМР (проведены в сотрудничестве с научной группой В. А. Алферовой) было подтверждено, что активное вещество, выделяемое данным штаммом – цистостатин.

Механизм действия цистостатина определяли и сравнивали с ближайшим структурным родственником – пурамицином – с использованием *in vivo* (двойной репортерной системы DualRep2, разработанной в лаборатории О.А. Донцовой рисунок 7, Г) и *in vitro* методов (*in vitro* трансляции в прокариотической (рисунок 7, А) и эукариотических системах (рисунок 7, Б), измерение значений IC50 (рисунок 7, В), BODIPY-системе (рисунок 8), а также toe-print анализ (рисунок 9).

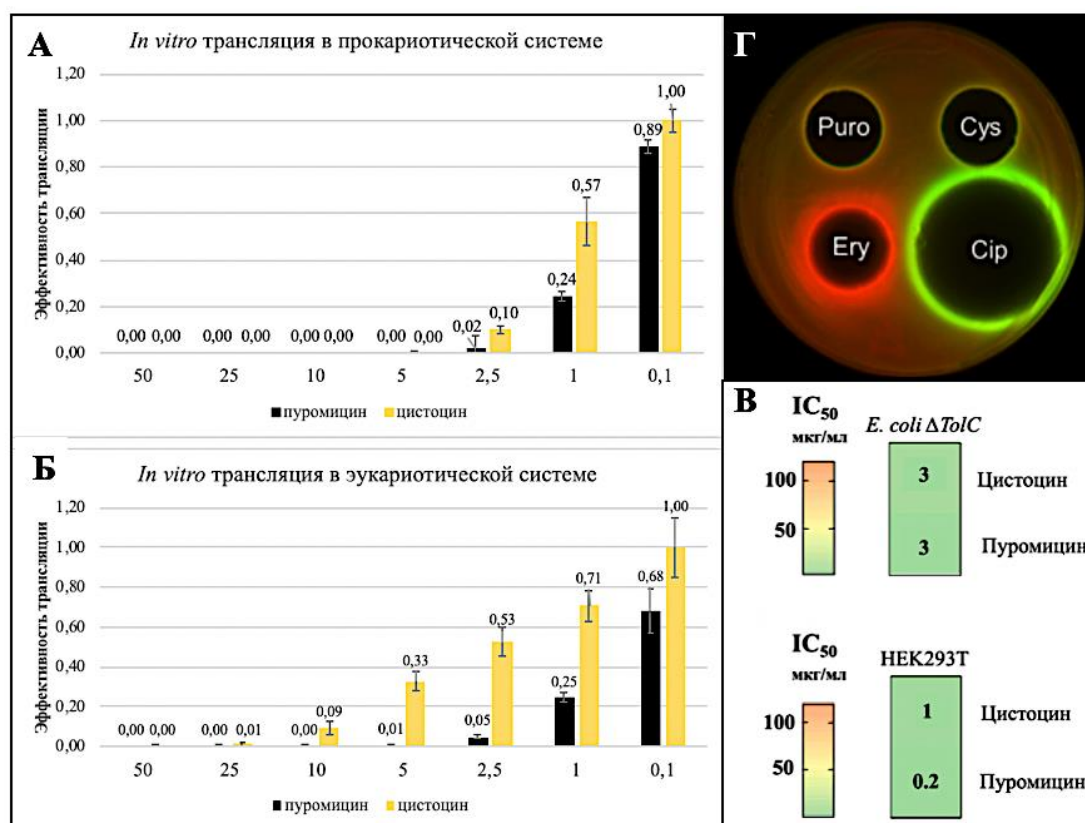


Рисунок 7. Сравнение влияния пуромизина и цистозина на трансляцию в прокариотической (А) и эукариотической (Б) системах *in vitro*. По оси Х отложены конечные концентрации пуромизина и цистозина в мкМ, а по оси У – эффективность трансляции. (В) Значения IC₅₀ для пуромизина и цистозина на клеточной линии HEK293T, в сравнении с линией *E. coli ΔTolC*. (Г) Сравнение механизма действия пуромизина и цистозина с использованием двойной репортерной системы DualRep2. Показаны Puro (20 мкг/мл) – пуромизин; и Cys (20 мкг/мл) – цистозин, а также контрольные антибиотики Ery – эритромицин (5 мкг/мл) и Cip – ципрофлоксацин (10 мкг/мл).

Оба антибиотика (цистозин и пуромизин) вызывают нарушение биосинтеза белка, поскольку можно наблюдать флуоресценцию от белка Katushka2S (красно-оранжевое гало на границе зоны ингибирования) (рисунок 7, Г). Было показано, что пуромизин в равной степени ингибирует как прокариотическую, так и эукариотическую трансляции в концентрации 2,5 мкМ и выше, в отличие от цистозина, который приблизительно в 5 раз хуже подавляет трансляцию в эукариотической, чем в прокариотической системе (рисунки 7, А, Б). Что также было подтверждено с помощью МТТ-теста: пуромизин является более токсичным для эукариотических клеток, чем цистозин, при одинаковых значениях IC₅₀ в бактериальной культуре (рисунок 7, В).

Сравнение механизмов действия цистозина и пуромизина проводили с помощью BODIPY-системы трансляции (рисунок 8) и toe-print анализа (рисунок 9).

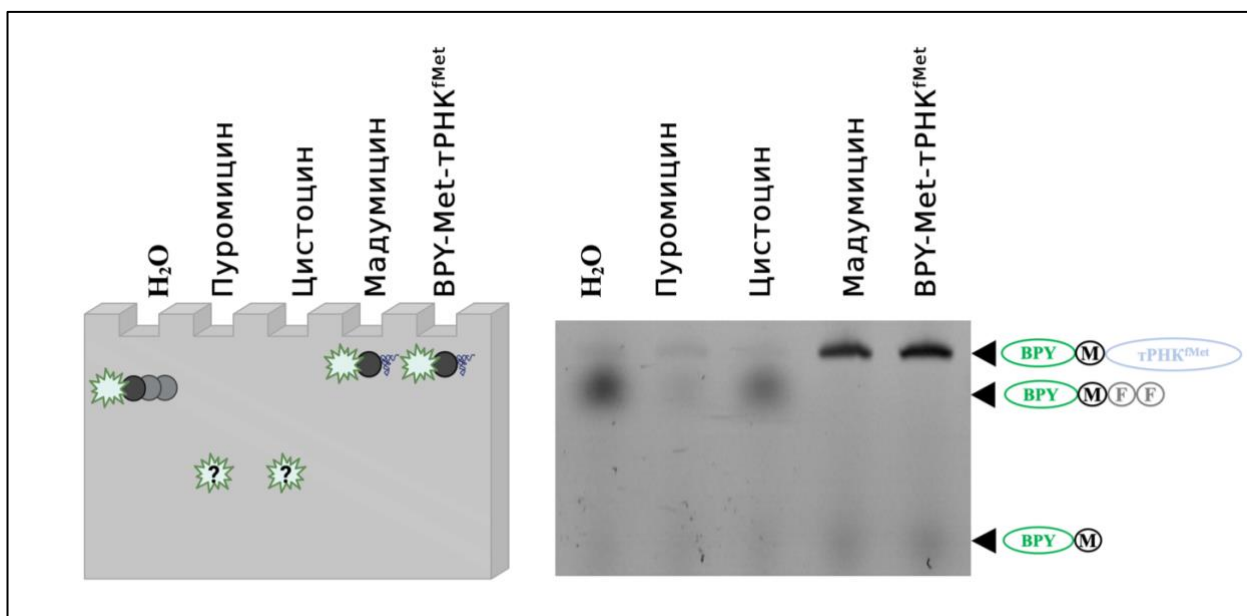


Рисунок 8. Сравнение механизма действия пурамицина и цистозина в BODIPY-системе. Слева – гипотетическая модель, справа – полученные экспериментальные данные (до гидролиза эфирной связи) в *in vitro* системе из очищенных компонентов с использованием MF2 ДНК-матрицы, исходной ВРУ-Met-тРНК^{fMet} и антибиотиков. Продукты реакции показаны черными стрелками. Антибиотики (в концентрациях 50 мкМ): пурамицин, цистозин и мадумицин. ВРУ обозначен зеленым овалом — метка BODIPY; черным кружком — остаток метионина (M); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — тРНК^{fMet}. Знаком вопроса в гипотетической модели обозначены продукты синтеза при добавлении пурамицина и/или цистозина в трансляционную систему.

Мадумицин – ингибитор образования первой пептидной связи – был использован в качестве положительного контроля: он полностью подавил биосинтез белка. В случае цистозина и (в большей степени) пурамицина продукта трансляции (BODIPY-меченного пептида MF2) значительно меньше по сравнению с отрицательным контролем – водой. При этом исходная ВРУ-Met-тРНК^{fMet} практически не визуализируется в геле, что указывает на ее расходование в процесс биосинтеза белка. Предполагалось, что продукты реакции переносятся на пурамицин и/или цистозин и не входят в гель. Данная гипотеза была подтверждена с помощью масс-спектрометрического анализа – обнаружено образование цистозин- и пурамицин-укороченных пептидов (выполнено в сотрудничестве с научной группой Алфёровой В. А.).

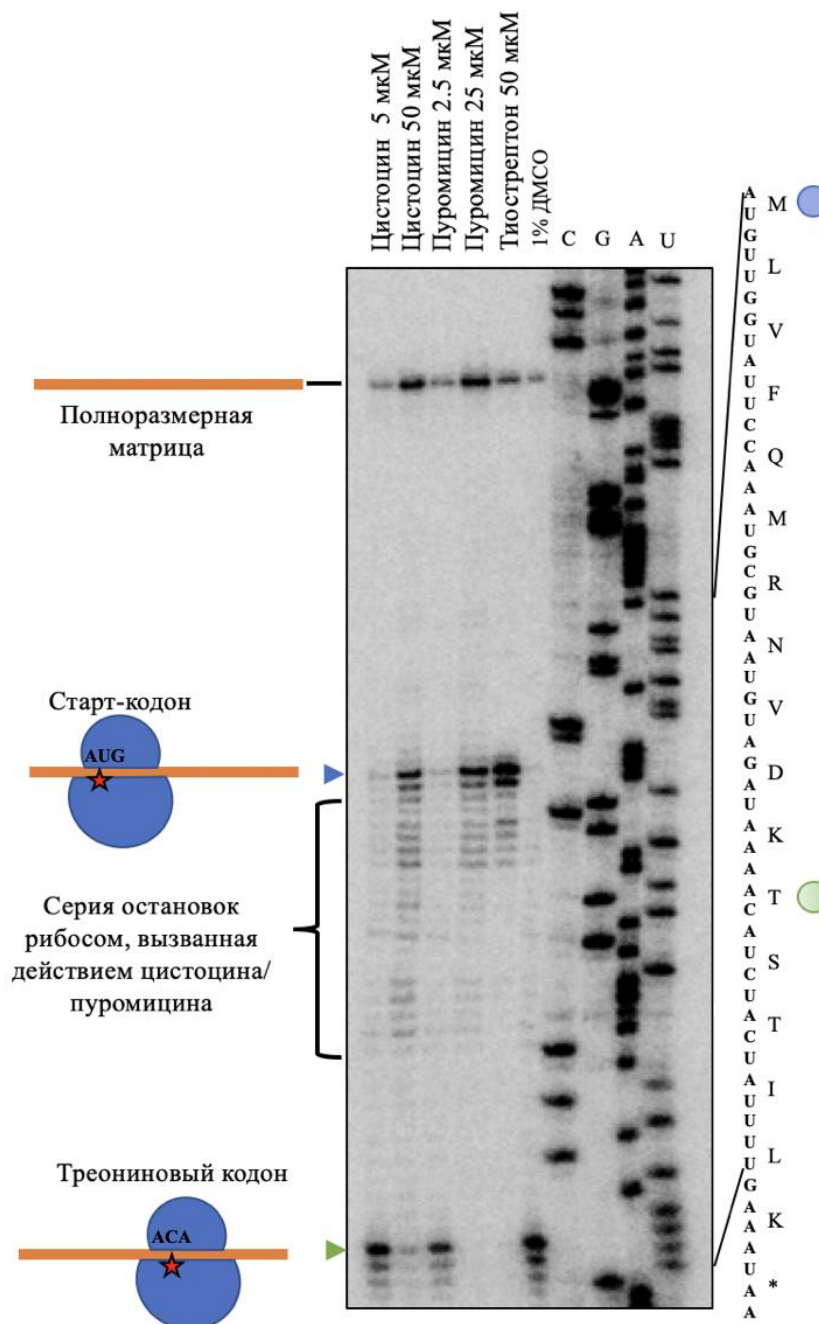


Рисунок 9. Тое-принт анализ на природной матрице *ermBL*. 1–4 дорожки соответствуют тестируемым антибиотикам – цистоцину (5 мкМ (1дорожка) и 50 мкМ (2 дорожка) и пуромидину – 2.5 мкМ (3дорожка) и 25 мкМ (4 дорожка); 5 дорожка – положительный контроль – тиострептон (50 мкМ) и отрицательный контроль – 1% ДМСО; U, A, C, G – дорожки секвенирования последовательности гена *ermBL*. Синим кружком обозначена остановка на стартовом кодоне (Р-сайт рибосомы), а зеленым – на треониновом кодоне (Р-сайт рибосомы).

Было показано, что при концентрации 25 мкМ для пуромидина остановка трансляции происходила вблизи стартового-кодона и рибосомы не достигали треонинового кодона (12 кодон), в то время как для цистоцина (50

мкМ) трансляция была частично подавлена и часть рибосом достигала 12 кодона (слабо выраженная полоса в дорожке 2). В более низких концентрациях пурамицин (2.5 мкМ) и цистосин (5 мкМ) не оказывали значимого влияния на трансляцию.

Необходимо отметить, что, несмотря на структурное сходство и подобный механизм действия пурамицина и цистосина, их влияние на эукариотические и прокариотические клетки немного отличается: так, в прокариотической системе, пурамицин (в отличие от цистосина) подавляет биосинтез белка в более низких концентрациях, однако по данным МТТ для НЕК293Т, цистосин в 8 раз менее токсичен по сравнению с пурамицином.

Часть 3. Терморубин

Результаты по данному разделу были опубликованы [4].

В 1964 году из *Thermoactinomyces antibioticus* был выделен ароматический антраценопираноновый антибиотик, имеющий структурное сходство с тетрациклинами (рисунок 10), названный терморубином (THR). Было показано, что терморубин подавляет *in vitro* трансляцию только в прокариотической системе, не воздействуя на трансляцию в эукариотических клетках. Однако из-за плохой растворимости терморубин не применялся в клинических исследованиях.

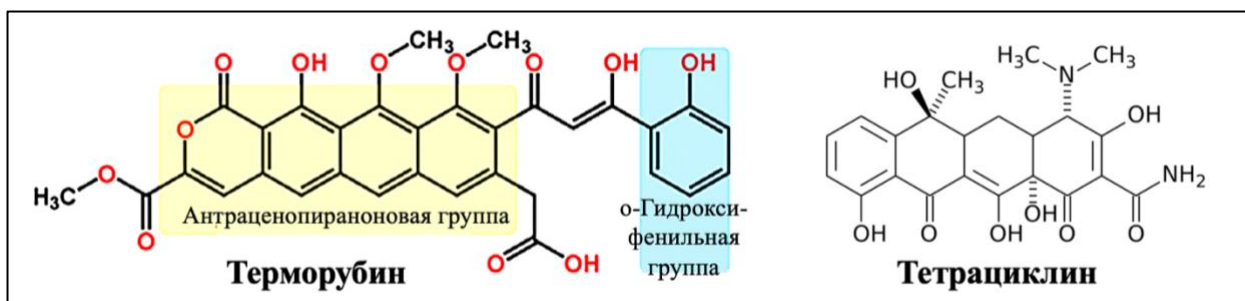


Рисунок 10. Сравнение структуры терморубина и тетрациклина. Оба антибиотика содержат четыре конденсированных циклических шестичленных кольца. Антраценопираноновая группа выделена желтым прямоугольником, орто-гидроксифенильная группа выделена голубым прямоугольником.

В 2012 году была опубликована первая структура вакантной 70S рибосомы (из грамотрицательной бактерии *Thermus thermophilus*) в комплексе с терморубином, который связывался в районе В2а-мостика (на стыке двух рибосомных субъединиц). Ученые выдвинули предположение, что из-за своего расположения терморубин мешает связыванию aa-тРНК в А-сайте рибосомы, тем самым препятствуя инициации трансляции. Однако детали механизма действия данного антибиотика оставались мало изученными.

В представленной работе было показано, что терморубин подавляет биосинтез белка в прокариотических клетках (рисунок 11, А – с

использованием двойной репортерной системы DualRep2), Б – определение МИК терморубина для грамположительных и грамотрицательных бактерий), а эффективность ингибирования трансляции зависит от концентрации антибиотика (рисунок 11, В).

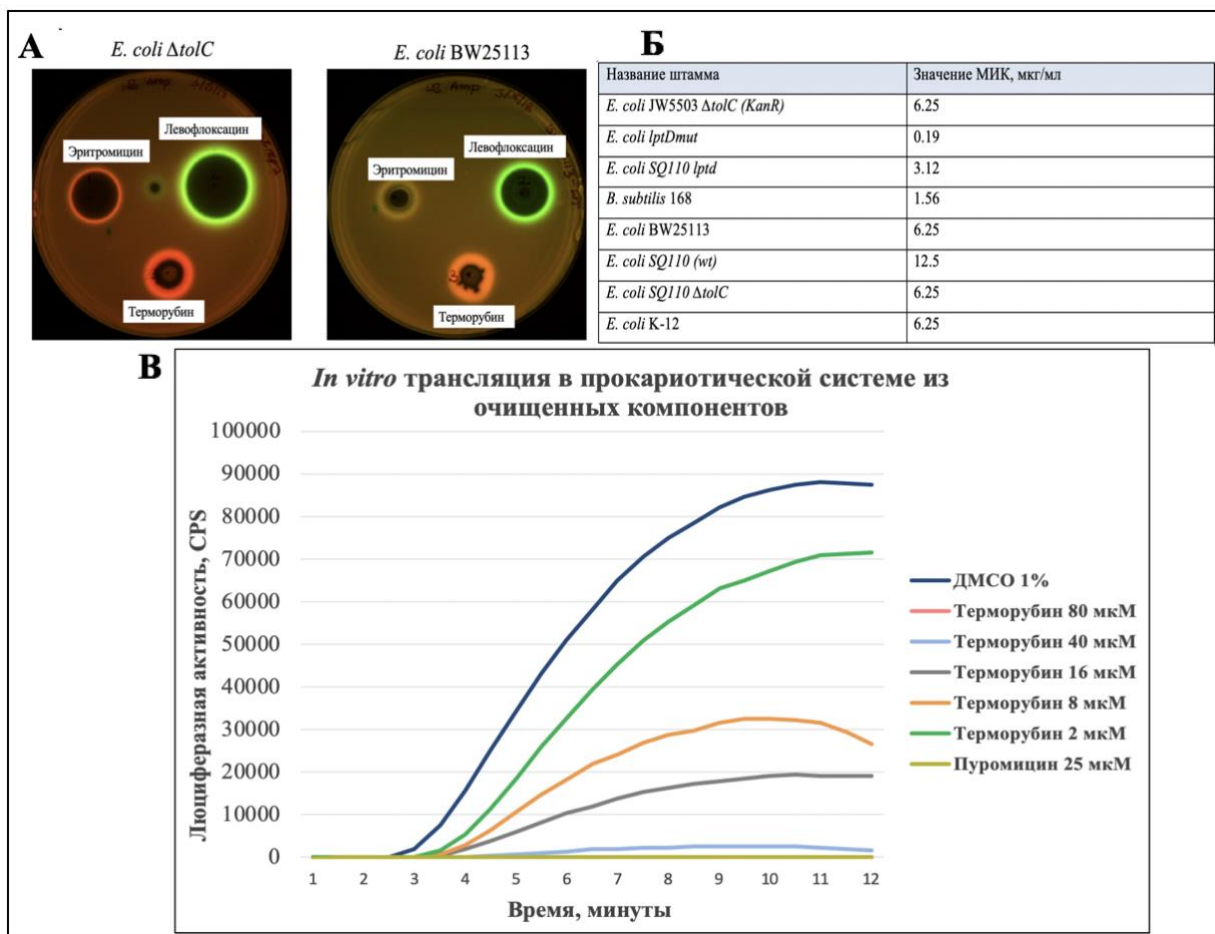


Рисунок 11. (А) Подтверждение влияния терморубина на биосинтез белка с помощью использования двойной репортерной системы DualRep2 на двух бактериальных штаммах – *E. coli* ΔtolC и *E. coli* BW25113 (дикий тип). Красный сигнал свидетельствует о нарушении биосинтеза белка, зеленый – индукция SOS-ответа клетки. Контрольные антибиотики: эритромицин – 5 мг/мл (*E. coli* ΔtolC) и 50 мг/мл (*E. coli* BW25113); левофлоксацин – 25 мкг/мл; терморубин – 10 мг/мл. (Б) Значение МИК терморубина на различных грамположительных и грамотрицательных штаммах. (В) Зависимость эффективности ингибирования *in vitro* трансляции от концентрации терморубина. Положительный контроль – желтая кинетическая кривая – пурамицин (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). По оси X отложено время в минутах.

Было показано, что терморубин активен как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (рисунки 11, А, Б), а также, что он полностью подавляет биосинтез белка в концентрации 40 мкМ

(рисунок 11, В).

Механизм действия терморубина был детально изучен всевозможными *in vitro* методами: изотопным и флуоресцентным toe-print анализом, с помощью BODIPY-системы, toe-seq метод, быстрыми измерениями кинетики (в сотрудничестве с научной группой А. Л. Коневеги), а также рентген-структурным анализом и крио-ЭМ (в сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона).

В представленной работе было продемонстрировано, что терморубин не оказывает прямого воздействия на инициацию трансляции, как ранее предполагалось (рисунки 12, А, Б, В).

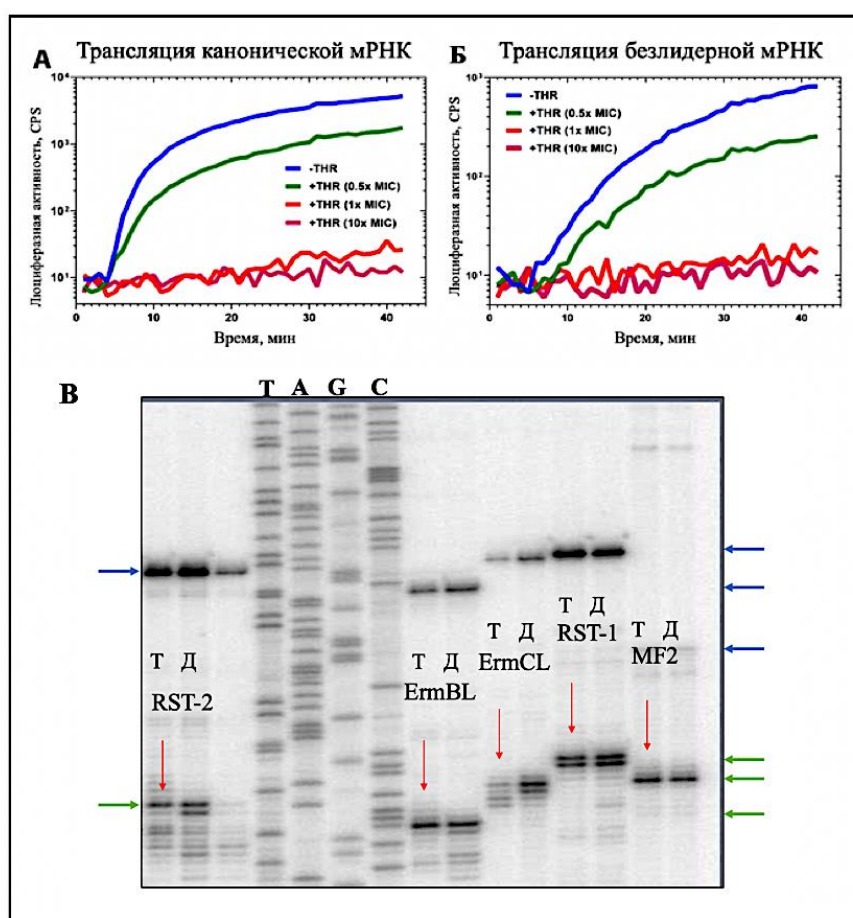


Рисунок 12. Ингибирование *in vitro* трансляции терморубином на канонических (с 5'НТО) (А) и безлидерных (Б) мРНК (без 5'-НТО). Синтез люциферазы *in vitro* без добавления терморубина (THR) (синяя кинетическая кривая) и в присутствии терморубина (в концентрациях, равных 0,5x – зеленая линия, 1x – красная линия и 10x МИК – пурпурная линия). (В) 61 Toe-print анализ на RST-2, ErmBL, ErmCL, RST-1 и MF2-матрицах. (Т, А, G, C) – дорожки секвенирования последовательности гена *ermBL*. Во все реакции добавлен тиострептон в концентрации 50 мкМ; Т – терморубин (80 мкМ) или Д – ДМСО 1%. Синими стрелочками обозначены полноразмерные матрицы кДНК RST-2, ErmBL, ErmCL, RST-1 и MF2. Зелеными стрелочками обозначены остановки на старт-кодонах, вызванные действием антибиотика тиострептона или тиострептона вместе с терморубином.

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. Поскольку терморубин подавил трансляцию обеих мРНК в равной степени (рисунки 12, А, Б) и не мешал сборке инициаторного комплекса (рисунок 12, В), то, был сделан вывод о том, что антибиотик не оказывал влияния на инициацию трансляции, а воздействовал на процессы элонгации и/или терминации трансляции.

С помощью Крио-ЭМ (В сотрудничестве с научными группами Ю. С. Поликанова и М. Г. Гагнона) были получены рентгенструктурные изображения комплекса 70S-терморубин с расположенными в А-, и в Р-сайтах тРНК (рисунок 13).

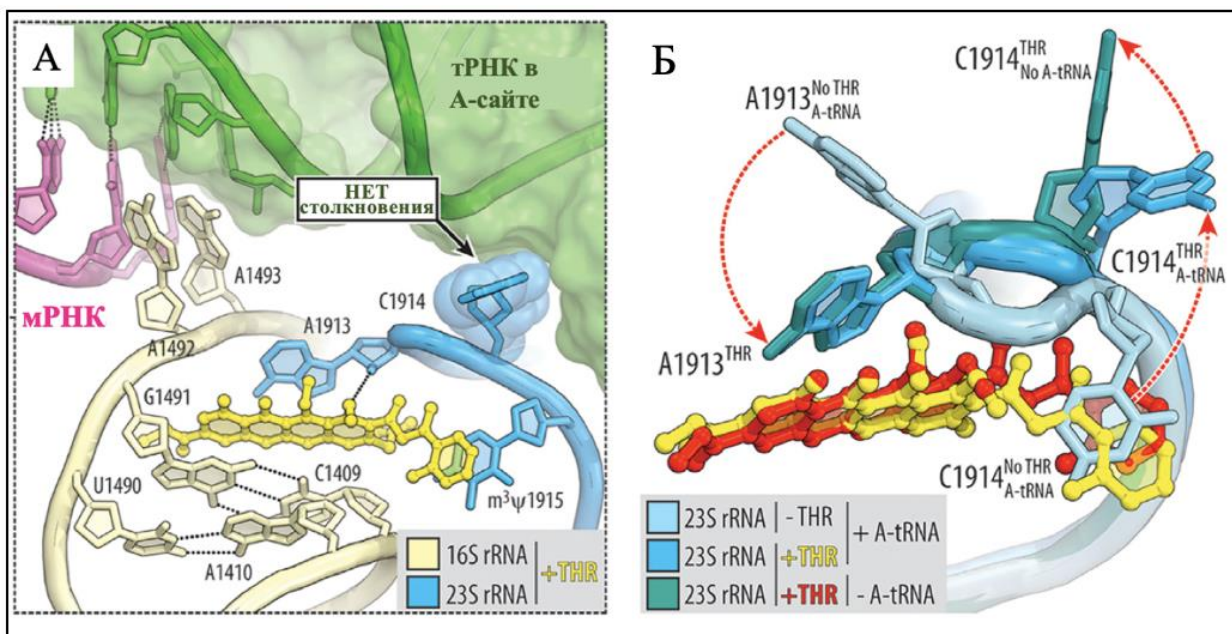


Рисунок 13. Крио-ЭМ структура комплекса 70S с терморубином и расположенными тРНК как в А-, так и в Р-сайтах (расположение терморубина рядом с декодирующим центром рибосомы). (А) С1914 принимает новую конформацию, в которой он не мешает связыванию тРНК. (Б) Структурные перестройки в декодирующем центре (красные пунктирные стрелки) при связывании терморубина и размещении тРНК в А-сайте: С1914 выворачивается таким образом, что позволяет тРНК правильно расположиться (переход от светло-голубого цвета к синему). В отсутствие тРНК в А-сайте С1914 полностью выворачивается (переход от синего цвета к сине-зеленому).

Было показано, что терморубин вызывает перестройки С1914 нуклеотида в рибосоме, однако при этом не мешает расположению инициаторной fMet-тРНК^{fMet} в Р-сайте, а aa-тРНК в А-сайте.

С помощью toe-print анализа (рисунок 14) было показано, что терморубин воздействовал на элонгацию и терминацию трансляции.

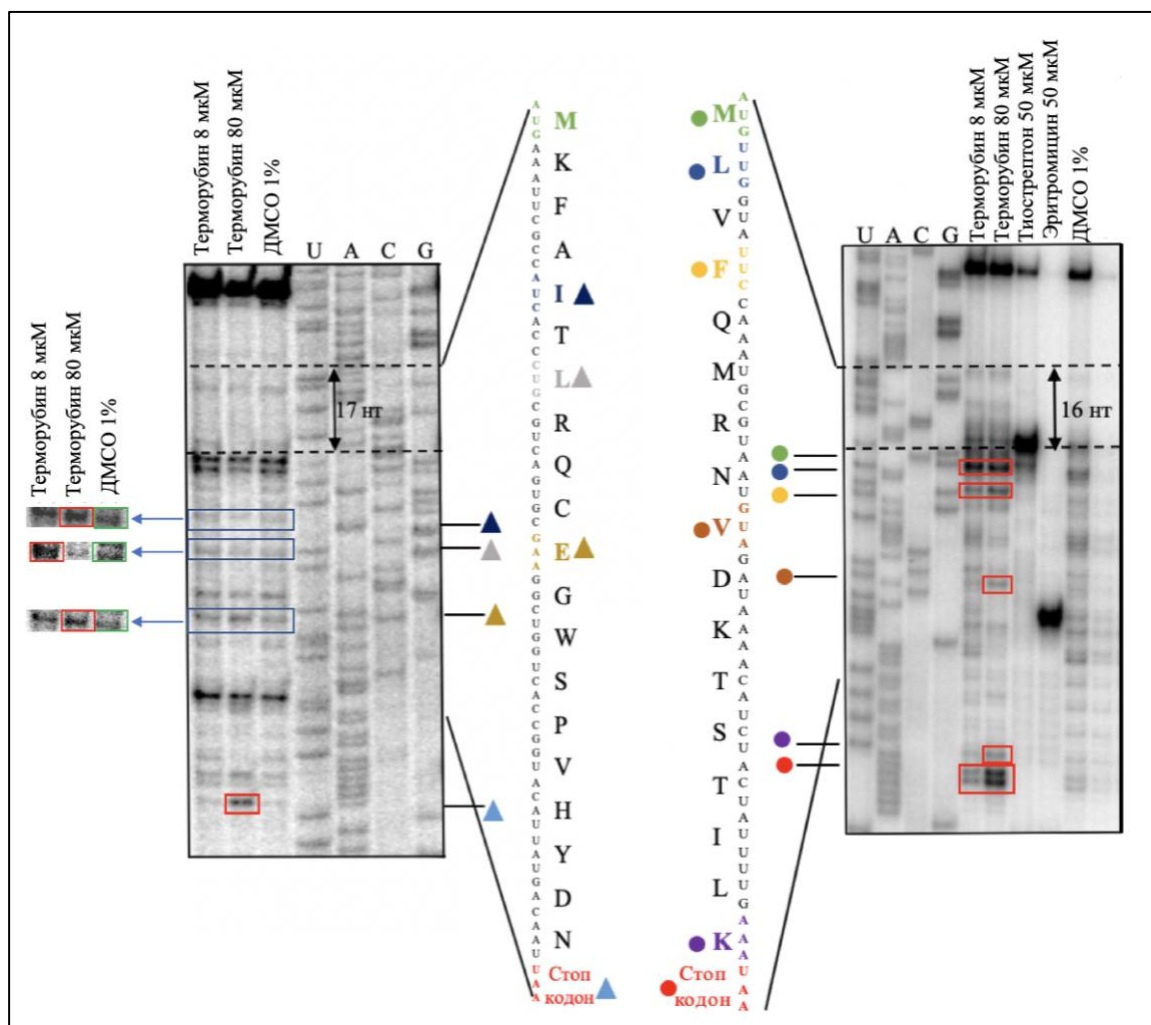


Рисунок 14. Toe-print анализ с использованием матрицы RST-2 (слева) и ErmBL (справа). Для RST-2 матрицы: 1 и 2 дорожки – терморубин в концентрации 8 и 80 мкМ; 3- отрицательный контроль 1% ДМСО; 4–7 дорожки (U, A, C, G) – дорожки секвенирования последовательности гена *rst-2*. Треугольниками обозначены 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 разных матрицах терморубин вызывал разный паттерн остановок, однако последовательность, способствующую торможению рибосом, не была выявлена (рисунок 15). Более того, по данным toe-seq анализа, аборт трансляции происходило после присоединения 2 или 3 аминокислоты.

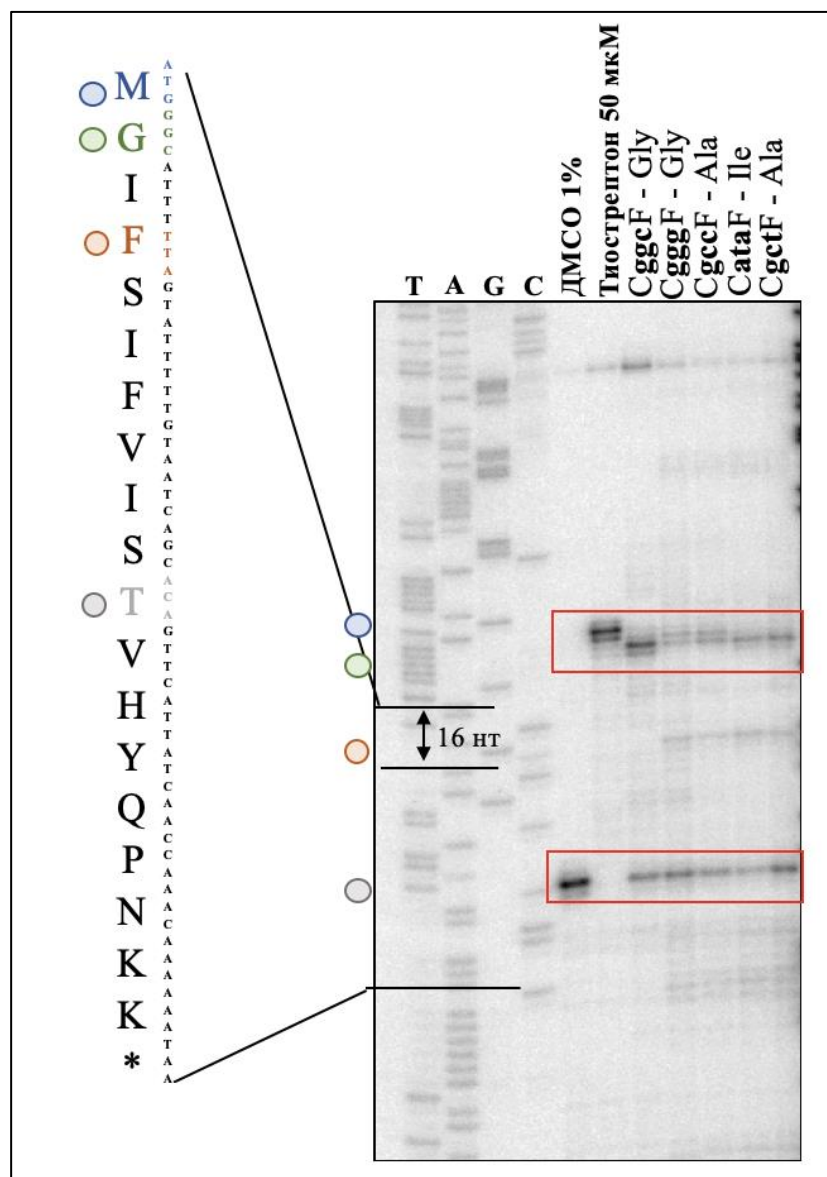


Рисунок 15. Toe-print анализ с использованием модифицированных ErmCL матриц. 1–4 дорожки (Т, А, G, С) – дорожки секвенирования последовательности гена *ermCL*, 5 дорожка – отрицательный контроль 1% ДМСО, 6 – положительный контроль – тиострептон (50 мкМ), 7–11 дорожки – терморубин (80 мкМ) на модифицированных матрицах ErmCL (7 – исходная матрица, 8 – матрица с синонимичной заменой второго кодона, 9 – матрица с заменой второго кодона (аланин вместо глицина), 10 – матрица с синонимичной заменой третьего кодона, 11 - матрица с заменой третьего кодона (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.

Поскольку модификации второго и третьего кодонов ErmCL матрицы не повлияли на остановку рибосом (toe-seq анализ также не выявил сиквенс специфичной последовательности), то было сделано заключение, что не существует зависимости между нуклеотидным контекстом и остановкой

рибосом под воздействием терморубина. Часть рибосом, действительно, способны добраться до стоп-кодона, и вызвать ингибирование терминации трансляции (рисунки 14, 17), однако чаще всего происходит аборт трансляции, что вызвано дестабилизацией aa-тРНК в А-сайте рибосомы (рисунок 16, В).

В сотрудничестве с научным коллективом А. Л. Коневеги, была предложена серия экспериментов (с использованием реконструированной системы трансляции *in vitro*), нацеленная на изучение влияния терморубина на: а) доставку aa-тРНК в А-сайт; б) пептидил-трансферазную реакцию; в) транслокацию (рисунок 16).

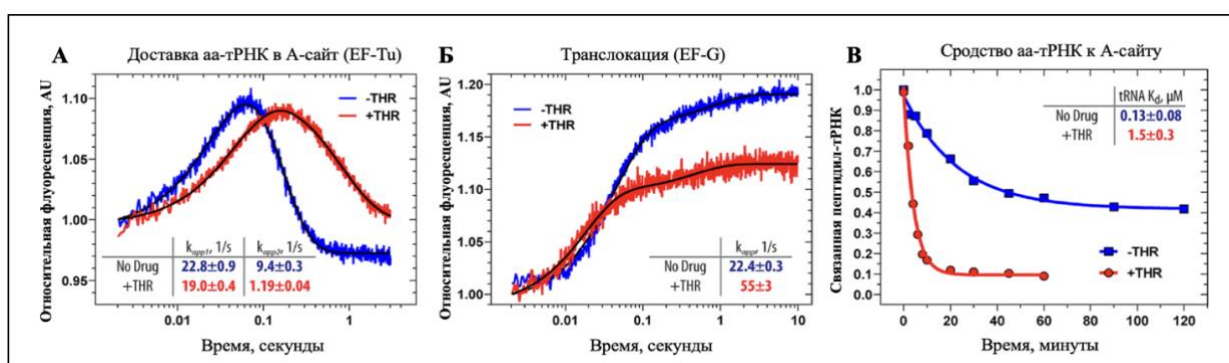


Рисунок 16. Влияние терморубина на элонгацию трансляции. (А) Кинетика связывания aa-тРНК в А-сайте рибосомы: взаимодействие тройного комплекса EF-Tu•GTP•Phe-тРНК^{Phe} с 70S рибосомами, содержащими инициаторную тРНК^{fMet} в Р-сайте в отсутствие (синяя кривая) и в присутствии (красная кривая) терморубина. (Б) Кинетика транслокации (взаимодействие рибосом 70S, содержащих деацилированную инициаторную тРНК^{fMet} в Р-сайте и fMet-Phe-тРНК^{Phe} 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 отсутствие (синяя кривая) или в присутствии (красная кривая) терморубина.

Исходя из полученных данных, терморубин не препятствовал связыванию aa-тРНК в А-сайте, но дестабилизировал ее, что в конечном итоге приводило к развитию двух взаимоисключающих вариантов: а) перед транслокацией происходило высвобождение дипептида из рибосомы (аборт трансляции) б) из-за неустойчивого положения aa-тРНК в А-сайте случалась быстрая транслокация и перенос пептидил-тРНК в Р-сайт.

С помощью разработанной BODIPY-системы было подтверждено влияние терморубина на терминацию трансляции (рисунок 17).

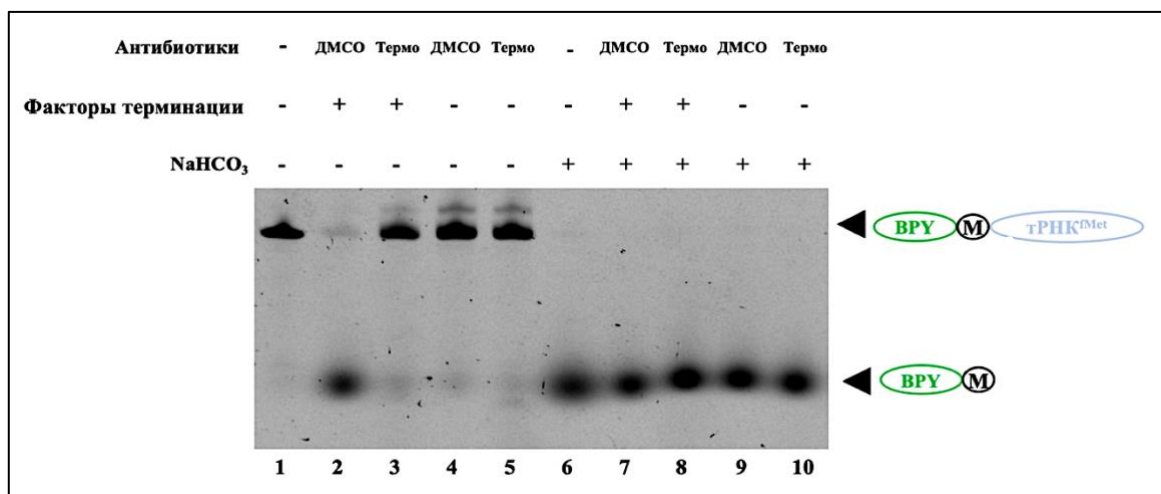


Рисунок 17. Изучение механизма действия терморубина с помощью BODIPY-системы. Продукты *in vitro* трансляции мРНК (с ДНК-матрицы), кодирующей М, в присутствии исходной BPY-Met-tRNA^{fMet}. Дорожки 1–5 соответствуют продуктам трансляции до гидролиза сложноэфирной связи; дорожки 6–10 – продуктам трансляции после гидролиза 1 М NaHCO₃. Дорожка 1 и 6 соответствуют исходной BPY-Met-tRNA^{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 (М); серым кружком — остаток фенилаланина (F); синим овалом — tRNA^{fMet}.

Используя ДНК-матрицу М (AUGUAA), сопряженную систему для транскрипции-трансляции (PURExpress Delta (aa, tRNA) Kit и PURExpress® Δ RF123 Kit, исходную BPY-Met-tRNA^{fMet} вместе с fMet-tRNA^{fMet} и факторы терминации (RFs 1+3), было показано, что даже добавление факторов терминации в систему не приводило к высвобождению продуктов реакции. Соответственно, терморубин ингибировал именно терминацию трансляции.

Рациональная модификация терморубина (например, добавление небольших по размеру гидроксильных групп к тетрациклиновой группировке, незначительно изменяющих расположение терморубина внутри рибосомы, вероятно, улучшит растворимость антибиотика в воде) позволит использовать его в клинических исследованиях. В представленной работе, было показано, что модификации терморубина по метильной группе (34) (взаимодействует с 2'-гидроксилом A1913) и о-гидроксифенильной группе (образует стэкинг-взаимодействие с m⁵U1915) запрещены. Однако, метильную группу (32) можно заменить на гидроксильную группу (данная позиция терморубина не участвует напрямую во взаимодействиях с рибосомой); более того, гипотетически возможно уменьшить количество двойных связей в ароматических кольцах для увеличения растворимости терморубина, делая его похожим на тетрациклин.

Заключение

В ходе данной работы была разработана уникальная BODIPY-система трансляции для анализа механизма действия антибиотиков, подавляющих биосинтез белка. Преимущество данной системы заключается в простоте ее использовании, дешевизне и скорости 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 двух исследованных антибиотиков – цистоцина и терморубина. Оказалось, что цистоцин – структурный аналог пурамицина – переносит на себя растущий полипептид, способствуя тем самым абортированию трансляции (механизм действия аналогичен пурамицину). Однако, в отличие от пурамицина, 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 данную стадию биосинтеза белка. 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 aa-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. Полученная информация о структуре антибиотика открывает широкий простор для его дальнейшей химической модификации.

Выводы

1. Разработана BODIPY-система на основе флуоресцентно меченного метионина, позволяющая детектировать в денатурирующем полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины, 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 – пурамицин: 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 aa-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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук.

1. **Marina Valeriya I.**, Bidzhieva Medina, Tereshchenkov Andrey G., Orekhov Dmitry, Sagitova Vladislava E., Sumbatyan Nataliya V., Tashlitsky Vadim N., Ferberg Artem S., Maviza Tinashe 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. **EDN: OYATLM; Импакт-фактор 3.4 (JIF); 1.3 печатных листа.**
2. Tolicheva O.A., Bidzhieva 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. **EDN: TJAXOF; Импакт-фактор 0.5 (JIF); 0.9 печатных листов.**
3. Alferova Vera A., Zotova Polina A., Baranova Anna A., Guglya Elena B., Belozeroval 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. **EDN: WBUXMG; Импакт-фактор 4.9 (JIF); 1.8 печатных листа.**
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. **EDN: HUICBM; Импакт-фактор 13.1 (JIF); 1.9 печатных листа.**

* Равнозначный вклад авторов