



Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный консультант** – **Сергиев Петр Владимирович** – доктор химических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химии природных соединений, профессор.
- Официальные оппоненты**
- **Карпова Галина Георгиевна** – доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН / Лаборатория структуры и функции рибосом, зав. лабораторией
  - Фролова Людмила Юрьевна** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук / Лаборатория структурно-функциональной геномики, зав. лабораторией
  - Олсуфьева Евгения Николаевна** – доктор химических наук, профессор, Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе Российской академии медицинских наук / Лаборатория химической трансформации антибиотиков, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится «29» ноября 2018 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, Лабораторный корпус «А», аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/144140221/>

Автореферат разослан «\_\_» сентября 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Смирнова И.Г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Открытие антибиотиков коренным образом изменило ситуацию в противостоянии человека и бактерии. Благодаря гениальной находке Александра Флеминга врачи и ученые получили эффективное, а самое главное селективное средство борьбы с бактериальными заболеваниями. В ходе последовавшего за этим «золотого века антибиотиков» было найдено множество разнообразных и эффективных молекул для борьбы с инфекциями. К сожалению, стремительное распространение среди бактерий генов устойчивости к антибиотикам привело к тому, что даже в развитых странах пациенты продолжают умирать от бактериальных инфекций. В связи с этим поиск новых антибиотиков остается важной практической задачей.

Около половины известных антибиотиков подавляет синтез белка, нарушая работу рибосомы на стадии инициации, элонгации или терминации. По сравнению с размером рибосомы антибиотики крайне маленькие молекулы, однако они способны полностью заблокировать работу этого сложного рибонуклеопротеидного комплекса. Такая эффективность достигается благодаря связыванию в функционально-значимых центрах рибосомы – пептидил-трансферазном, декодирующем, а также в рибосомном туннеле, через который выходит синтезируемый пептид. Интересно, что антибиотики с различной структурой могут связываться в одном и том же участке и даже контактировать с одними и теми же нуклеотидами. Таким образом, даже зная химическое строение неизвестного ранее антибиотика, невозможно предсказать, будет ли рибосома или аппарат трансляции его мишенью. Разработке быстрого и эффективного метода поиска антибиотиков, нарушающих работу рибосомы, посвящена данная работа.

Созданная нами репортерная система поиска антибиотиков обладает уникальным свойством. Она позволяет обнаружить разнородные по химическому строению антибиотики, нарушающие синтез белка и сходные между собой только по механизму их действия. Совершенно разные молекулы, найденные и изученные в работе: амикумацин А, клебсазолицин и мадумицин II нарушают синтез белка и вызывают индукцию экспрессии репортерного белка. Использование данной системы в высокопроизводительном режиме делает направленный поиск ингибиторов синтеза белка более эффективным и будет способствовать разработке новых антибактериальных препаратов.

## Цели и задачи исследования

Основная цель работы заключалась в поиске и изучении механизма действия ингибиторов синтеза белка.

Для этого было необходимо:

- 1) Разработать новый метод направленного поиска ингибиторов синтеза белка.
- 2) Верифицировать разработанный метод с помощью известных ингибиторов трансляции.
- 3) Провести поиск новых ингибиторов синтеза белка и подробно изучить структуры и механизм действия найденных соединений.

## Научная новизна работы

Разработан новый метод поиска антибиотиков, нарушающих трансляцию. Метод основан на индукции экспрессии репортерного флуоресцентного белка *Katushka2S* при сублетальной концентрации ингибиторов синтеза белка. Большинство существующих репортерных систем позволяет определять антибиотики, относящиеся к конкретному классу и имеющие структурное сходство. Наша репортерная система, основанная на модифицированном аттенуаторе триптофанового оперона *E. coli*, дает возможность детектировать широкий набор различных ингибиторов трансляции, которые не имеют между собой структурного сходства и взаимодействуют в разными субчастицами рибосомы. Эти антибиотики объединены общим механизмом действия: ингибированием рибосомы на стадии элонгации трансляции.

При помощи разработанной системы обнаружены два новых ингибитора синтеза белка – тиазол-оксазол-модифицированный пептид клебсазолицин и антибиотик, содержащий изокумариновую группу, амикумацин А. Изучение механизма их действия при помощи биохимических и структурных методов показало, что клебсазолицин, как макролиды и стрептограминны Б, блокирует продвижение пептида по туннелю, а амикумацин А действует по новому механизму: препятствует транслокации за счет образования контакта между 16S рРНК и мРНК. В ходе работы получены новые данные о механизме действия стрептограминнов класса А. Оказалось, что эти антибиотики не препятствуют связыванию А- и Р-сайтовых тРНК, но нарушают правильное позиционирование их 3'-концов, а также приводят пептидил-трансферазный центр рибосомы в неактивное состояние, что в итоге блокирует рибосому и ингибирует синтез белка.

## **Практическая значимость работы**

Созданная репортерная система pDualrep2 может быть использована при высокопроизводительном поиске новых антибиотиков, нарушающих синтез белка. Скрининг антибиотиков при помощи разработанной репортерной системы легко поддается автоматизации, не требует больших затрат времени и ресурсов. Данный подход сохраняет все преимущества классического анализа эффективности действия новых антибактериальных соединений, метода диффузии в агаре, в котором по размеру зоны ингибирования можно судить об эффективности. Дополнительно к этому, наш подход позволяет получить данные о механизме действия антибиотика, дает возможность проводить рациональную модификацию и оптимизацию молекулы, что значительно ускоряет процесс создания новых антибиотиков.

В ходе работы найдены новые антибиотики - ингибиторы синтеза белка. Проведенный в работе биохимический и структурный анализ взаимодействия антибиотиков с рибосомой открывает дорогу для создания новых антибактериальных препаратов.

## **Положения, выносимые на защиту**

- Разработана репортерная система pDualrep2, предназначенная для направленного поиска новых ингибиторов синтеза белка.
- Система pDualrep2 позволяет детектировать антибиотики разной структуры и с разными сайтами связывания в рибосоме, объединенные общим механизмом действия.
- Мадумицин II, представитель стрептограминов A, не препятствуют связыванию тРНК с A- и P-сайтами, но нарушает правильное позиционирование их 3'-концов.
- Клебсазолицин – новый ингибитор синтеза белка, связывается в пептидном туннеле и блокирует продвижение рибосомы по мРНК.
- Амикумацин A – новый ингибитор синтеза белка, взаимодействует одновременно с 16S рРНК и мРНК и блокирует транслокацию.

## **Личный вклад автора**

Докторская диссертационная работа выполнена автором лично. Междисциплинарные исследования проводились в соавторстве с большим коллективом, что отражено в опубликованных работах, однако автору принадлежит основная роль в выборе направления исследований, решении рабочих вопросов, преодолении различных экспериментальных проблем, в обобщении и представлении полученных результатов. Личный вклад автора

состоял в непосредственном участии во всех этапах исследования – от формулировки проблем, постановки задач и проведения экспериментов до обсуждения и оформления результатов. Некоторые экспериментальные исследования при непосредственном участии автора были проведены аспирантом факультета Биоинженерии и Биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова Комаровой Е.С.

### **Апробация работы**

Диссертация апробирована на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 18 мая 2018 года, отдельные разделы работы в период с 2014 по 2018 годы представлялись в виде докладов и тезисов докладов на 20-и Всероссийских и Международных научных конференциях, в частности, на специализированной Международной конференции «Синтез белка и контроль трансляции» / Protein Synthesis and Translational Control в 2017 и 2013 годах, на 43-ем конгрессе федерации биохимических обществ Европы (FEBS), проходившем 7-12 июля 2018 в г. Прага, Чехия.

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы отражены в 17 статьях в журналах, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science или Scopus, а также в библиографической базе PubMed. В рамках выполнения диссертационной работы получено 2 патента Российской Федерации.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы» (раздел состоит из 299 ссылки) и «Благодарности». Работа иллюстрирована 169 рисунками и 11 таблицами. Общий объем диссертации 291 страница.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Высокопроизводительная система обнаружения ингибиторов синтеза белка.

#### 1.1. Создание двойной репортерной конструкции pDualrep2.

Для эффективного поиска антибиотиков, подавляющих синтез белка, необходимо получать информацию о механизме действия уже на стадии определения эффективности. Наиболее распространенный способ обнаружения какого-либо клеточного ответа, в том числе и ответа на обработку антибиотиком, заключается в использовании так называемых генов-репортеров. Экспрессия гена-репортера должна повышаться в случае специфического изменения биохимических процессов клетки, которое мы хотим детектировать. Ингибитор синтеза белка должен подавлять синтез всех белков, в том числе и белка-репортера, но при сублетальной концентрации, если относительная экспрессия гена-репортера будет повышена, этого будет достаточно, чтобы детектировать сигнал. Уже создано несколько систем обнаружения ингибиторов трансляции на основе увеличения относительного сигнала экспрессии гена-репортера. Однако, основной недостаток ранее разработанных систем заключается в том, что они позволяют обнаружить только конкретные классы соединений, объединенных структурным сходством, а не механизмом действия.

Наша задача заключалась в разработке системы для обнаружения ингибиторов синтеза белка, объединенных общим механизмом действия, а не структурным сходством. Бактериальная трансляция происходит одновременно с транскрипцией. РНК-полимераза продолжает синтезировать цепь мРНК, с которой рибосома уже может связываться, начиная синтез белка. Это свойство бактериальной трансляции активно используется в регуляции экспрессии генов. Так один из самых известных примеров регуляции транскрипции за счет трансляции – это аттенуация транскрипции генов биосинтеза триптофанового оперона *E. coli* (рис. 1).



Рисунок 1. Регуляция экспрессии генов, необходимых для биосинтеза триптофана. А. Вторичная структура участка мРНК, формирующаяся при недостатке триптофана, при котором образуется шпилька 2-3 и терминации транскрипции не происходит. Б. Вторичная структура участка мРНК, формирующаяся при избытке триптофана, когда образуется шпилька 3-4, стимулирующая терминацию транскрипции.

начале оперона, отвечающего за биосинтез триптофана, закодирован короткий пептид TrpL, содержащий два триптофановых остатка подряд. Для того, чтобы не синтезировать собственный триптофан, когда его много в питательной среде, бактериальные клетки разработали красивую систему регуляции. РНК-полимераза начинает транскрибировать оперон и быстро доходит до так называемой паузной шпильки, на которой транскрипция останавливается, а в это время рибосома инициирует трансляцию *trpL* и при недостатке триптофана останавливается, когда в А-сайте оказывается кодон триптофана. Остановка рибосомы в этом положении стабилизирует шпильку 2-3 (рис. 1А), что в свою очередь не дает образоваться шпильке 3-4, которая представляет собой терминатор транскрипции. В отсутствие терминаторной шпильки РНК-полимераза продолжает транскрипцию, и в итоге увеличивается количество мРНК генов биосинтеза триптофана и, как следствие, самого триптофана. При избытке триптофана и соответственно Trp-тРНК<sup>Trp</sup> рибосома не останавливается на триптофановых кодонах. Она быстро транслирует лидерный пептид и останавливается на стоп-кодоне, так как терминация трансляции более медленный процесс, чем элонгация. В таком положении рибосома уже не может стабилизировать шпильку 2-3, в результате чего образуется терминаторная шпилька 3-4, РНК-полимераза не может двигаться дальше и биосинтез триптофана подавляется (рис. 1Б).

Антибиотики, замедляющие трансляцию в сублетальной концентрации, должны замедлять и рибосому, синтезирующую лидерный пептид TrpL. Это, в свою очередь, должно увеличивать уровень транскрипции расположенного после регуляторного элемента гена флуоресцентного белка, на который в нашей системе были заменены гены биосинтеза триптофана. Для того, чтобы сделать эту систему независимой от количества триптофана, мы заменили два триптофановых кодона на два аланиновых. Концентрация аланина в клетках довольно высока, поэтому в обычных условиях рибосома всегда быстро транслирует такой лидерный пептид, что приводит к терминации транскрипции (рис. 2Б). В случае же антибиотиков, замедляющих трансляцию, рибосома, останавливаясь на лидерном пептиде TrpL, будет способствовать антитерминации и повышению экспрессии репортерного белка (рис. 2А).

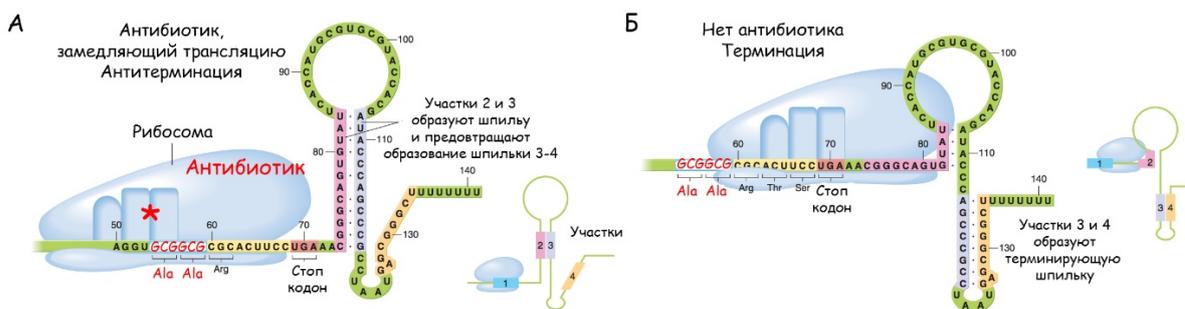


Рисунок 2. Схема регуляторного элемента репортерной системы для обнаружения ингибиторов трансляции. А. Вторичная структура участка мРНК, формирующаяся в присутствии ингибитора синтеза белка, образуется шпилька 2-3 и терминации транскрипции не происходит. Б. Вторичная структура участка мРНК, формирующаяся в отсутствии ингибиторов синтеза белка, образуется шпилька 3-4, стимулирующая терминацию транскрипции.

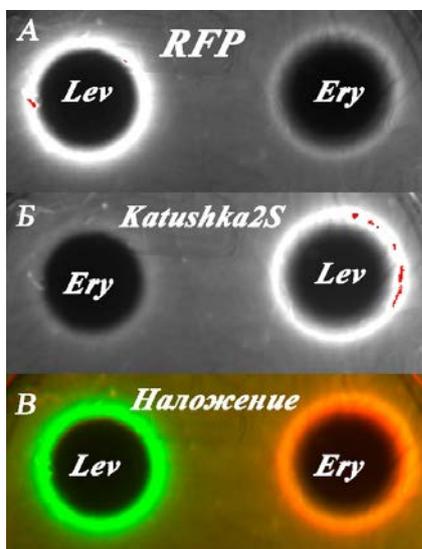
Мы решили, что для высокопроизводительного скрининга было бы более эффективно в одном тесте выявлять не только ингибиторы синтеза белка, но и соединения, нарушающие биосинтез ДНК. Подобного рода антибиотики демонстрируют высокую активность и селективность. Многие гены, участвующие в репарации ДНК, регулируются при помощи транскрипционного репрессора LexA. Повреждение ДНК, а именно образование одноцепочечных участков, приводит к активации белка RecA. В активированной форме этот белок способен разрезать репрессор LexA и нарушать его связывание с промоторами генов SOS-ответа, после чего уровень транскрипции этих генов увеличивается. Промотор одного из таких генов – *sulA* был использован для создания репортера, реагирующего на индукцию SOS-ответа.

На основе двух флуоресцентных белков TurboRFP и Katushka2S создана репортерная конструкция pDualrep2, в которой экспрессия TurboRFP должна увеличиваться в случае активации SOS-ответа, а Katushka2S в присутствии ингибиторов синтеза белка. Несмотря на то, что оба белка «красные», для глаза один темно-красный или даже вишневый (Katushka2S), а другой скорее оранжевый (TurboRFP), их можно детектировать по отдельности, так как спектры поглощения и испускания перекрываются незначительно (TurboRFP (553/574 нм) (273) и Katushka2S (588/633 нм)).

## 1.2. Верификация полученной репортерной конструкции при помощи антибиотиков с известным механизмом действия.

Для проверки активации репортерных генов соответствующими антибиотиками, а также подтверждения возможности совместного использования двух флуоресцентных белков, плазмидой pDualrep2 трансформировали штамм *Escherichia coli* BW25513, а затем клетки, содержащие плазмиды, наносили «газоном» на чашку Петри с питательной средой

LB. В качестве индуктора SOS-ответа использовали ингибитор гиразы фторхинолон левофлоксацин, эритромицин был выбран как классический ингибитор трансляции, замедляющий синтез белка (рис. 3А, Б). Как и ожидалось, эритромицин вызывает повышенную экспрессию белка Katushka2S, в то время как присутствие левофлоксацина



повышает количество TurboRFP. Для удобства восприятия вместо двух черно-белых картинок решено использовать одну цветную, в которой сигнал Katushka2S заменялся на красный цвет, а белка TurboRFP на зеленый (рис. 3В).

Рисунок 3. Индукция репортерной системы pDualrep2 эритромицином (Ery) и левофлоксацином (Lev). На бактериальный газон штамма BW25513-pDualrep2 наносили 20 мкг эритромицина и 2 мкг левофлоксацина и инкубировали 18 часов, затем сканировались в режиме для детектирования флуоресценции TurboRFP (А) или Katushka2S(Б). В. Наложение результатов А и Б.

Для дальнейшей верификации репортера мы использовали большой набор ингибиторов синтеза белка, различающихся как химическим строением, так и местами связывания с рибосомой. Индукцию репортера, реагирующего на подавление синтеза белка, вызывают 14- членные (эритромицин), 15- членные (азитромицин) и 16- членные (тилозин) макролиды, хлорамфеникол, линкомицин, тетрациклин, спектиномицин, стрептограмины А и Б (гризеомицин и этамицин), амикумадин А, гигромицин Б и фузидовая кислота (рис. 4).

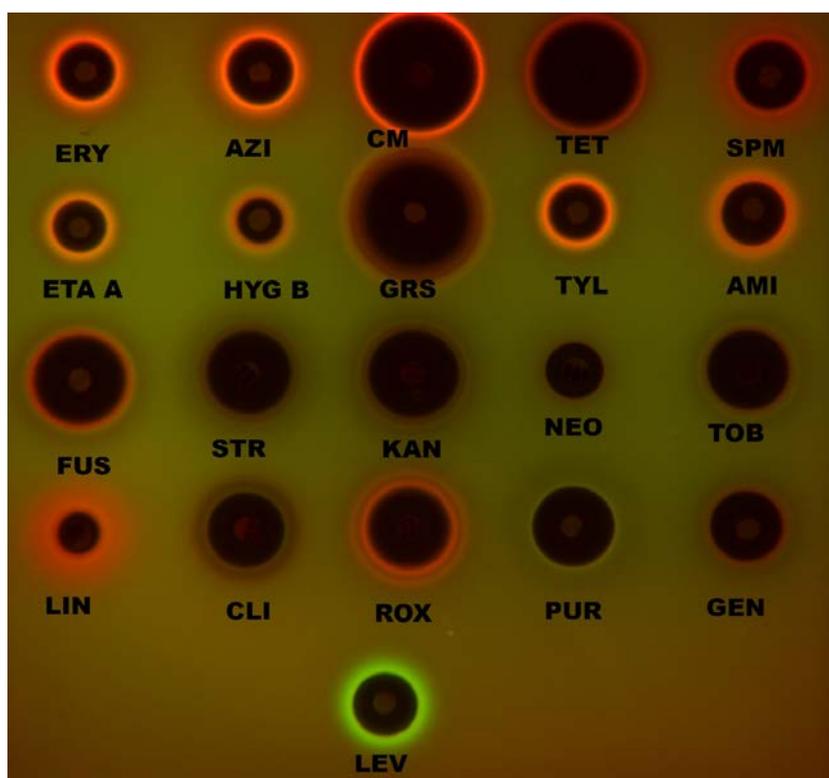


Рисунок 4. Индукция экспрессии гена *Katushka2S* различными ингибиторами трансляции на бактериальном газоне штамма BW25513-pDualrep2. Эритромицин (ERY), рокситромицин (ROX), ацитромицин (AZI), хлорамфеникол (CM), канамицин (KAN), тетрациклин (TET), стрептомицин (STR), линкомицин (LIN), клиндамицин (CLI), тобрамицин (TOB), неомицин (NEO), спектиномицин (SPM), этамицин А (ETA А), гигромицин В (HYG В), гризеоиридин (GRS), тилозин (TYL), амикумацин А (AMI), фузидовая кислота (FUS), пурамицин (PUR) и гентамицин (GEN). Активатор SOS-ответа левофлоксацин (LEV), представлен, как контроль.

Большинство аминогликозидов (канамицин, неомицин и тобрамицин), стрептомицин и пурамицин не индуцируют экспрессию *Katushka2S*. Индукция TurboRFP вызывается как синтетическими ингибиторами гиразы хинолонами (левофлоксацин, норфлоксацин и налидиксовая кислота), так и микроцином В17, тот же эффект оказывает ингибитор топоизомеразы II этопозид и ингибитор биосинтеза нуклеиновых кислот сульфониламид (рис. 5). Полимиксин и фурагин, действующий на клеточную мембрану и нарушающий окислительные процессы, соответственно, не индуцируют ни тот, ни другой репортер, хотя эффективно подавляют рост клеток. Рифампицин незначительно активизирует репортер на повреждение в ДНК, хотя механизм его действия связан с нарушением транскрипции.

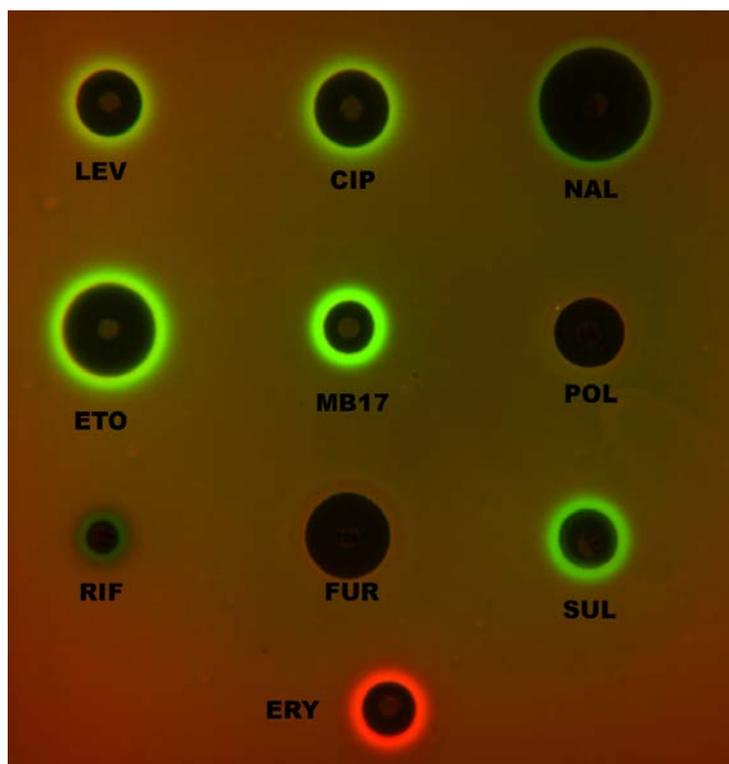


Рисунок 5. Индукция экспрессии белка TurboRFP различными индукторами SOS-ответа на бактериальном газоне штамма BW25513-pDualrep2. Сульфониламид (SUL), полимиксин (POL), рафампицин (RIF), налидиксовая кислота (NAL), левофлоксацин (LEV), ципрофлоксацин (CIP), этопозид (ETO), фурагин (FUR), микроцин Б17 (MB17). Ингибитор трансляции эритромицин (ERY), представлен, как контроль.

Наш подход по сравнению с другими репортерными системами, используемыми для определения механизма действия антибиотиков, система разработанная нами, позволяет определить механизм действия большого числа различных по структуре молекул, имеющих при этом даже различные места связывания с мишенями. Соединения, активирующие каждый из репортерных генов, объединены общим механизмом действия, замедлением синтеза белка или индукцией SOS-ответа.

Разработанная система позволяет одновременно с оценкой эффективности антибиотика по размеру зоны ингибирования, получить информацию о механизме действия по индукции одного из двух репортерных генов. Это не единственное её преимущество по сравнению с классическим методом анализа зон ингибирования. Благодаря тому, что необходимая для индукции концентрация вещества, очевидно, меньше минимальной ингибирующей, метод оказывается более чувствительным. Разработанная репортерная система создана на основе генетических элементов *E.coli* и расположена на плазмиде, которая способна реплицироваться только в *E.coli*. Это означает, что адекватно использоваться она может только в этой бактерии. В то же время *E.coli* – это грамотрицательная бактерия, обладающая внешней мембраной, которая делает ее менее чувствительной ко многим антибиотикам, которые могут действовать на грамположительные бактерии. В связи с тем, что мы предполагали использовать разработанный подход для наиболее широкого поиска новых ингибиторов синтеза белка, оказалось необходимым повысить чувствительность нашего репортерного штамма. Один из общих механизмов защиты бактерии от антибиотика – это активный экспорт его из клетки за счет систем эффлюкса. Удаление из генома *E.coli* гена *tolC*, компонента AcrAB–TolC эффлюкс системы делает клетки этой бактерии значительно более чувствительными ко многим антибиотикам, в том числе к тем, которые подавляют рост только грамположительных бактерий. В связи с этим, нами выбран для работы генно-модифицированный штамм *E.coli* JW5503, с инактивированным геном белка TolC, трансформированный плазмидой pDualrep2. Использование такого штамма позволило значительно повысить чувствительность репортерной системы.

Мы показали, что индукцию экспрессии гена *Katushka2S* вызывает большой набор ингибиторов трансляции. Ни одна из ранее созданных репортерных систем не охватывает так широко класс ингибиторов трансляции, при этом антибиотики, для которых показан другой механизм действия, индукции экспрессии *Katushka2S* не вызывают.

Самый первый антибиотик, протестированный в репортерной системе – это эритромицин; его механизм действия, связывание в туннеле и препятствие продвижению

рибосомы по мРНК, идеально соответствует условиям необходимым для индукции репортерного сигнала. Торможение рибосомы на мРНК при обработке эритромицином используется в природе для регуляции генов устойчивости к этому антибиотику. В научной литературе описана репортерная конструкция для детекции эритромицина и других 14-членных макроциклов, созданная на основе последовательности лидерного пептида ErmCL, который регулирует экспрессию метилтрансферазы ErmC, защищающей клетку от некоторых макролидов. Интересно, что эта система не позволяет детектировать 15-членные (азитромицин) и 16-членные (тилозин) макролиды, в то время, как и тот, и другой вызывают индукцию репортерного белка в системе pDualrep2.

Хлорамфеникол вызывает заметное увеличение экспрессии белка Katushka2S. Этот антибиотик препятствует связыванию тРНК с А-сайтом. Удивительно, что линкомицин и клиндамицин, связывающиеся с тем же участком рибосомы, что и хлорамфеникол, по-разному действуют на наш репортер. Линкомицин индуцирует экспрессию Katushka2S, а клиндамицин – нет. Несмотря на то, что линкомицин и клиндамицин очень похожи, их сайты связывания в рибосоме могут немного отличаться, поскольку клиндамицин защищает от модификации нуклеотид A2059 23S рРНК, а линкомицин нет. Возможно, эти антибиотики останавливают рибосомы на разном расстоянии от стартового кодона, в результате чего индукция экспрессии сигнального гена происходит по-разному или же несмотря на структурное сходство механизмы действия этих антибиотиков различаются сильнее, чем предполагалось.

Представители обоих классов стрептограминов, этамицин А (стрептограмин В) и гризеоиридин (стрептограмин А), индуцируют экспрессию Katushka2S, но с разной эффективностью. Сайты связывания этих антибиотиков различаются: гризеоиридин блокирует А- и Р-сайты, а этамицин А связывается в начале рибосомного туннеля, рядом с сайтом связывания макролидов. Сильная индукция репортерного белка этамицином А – ожидаема, так как он похож на макролиды и по механизму действия, и по месту связывания. Имеющиеся биохимические и структурные данные указывают на то, что антибиотики этого класса останавливают трансляцию после образования нескольких пептидных связей, чего, судя по всему, достаточно для активации созданной нами репортерной конструкции. Гризеоиридин – стрептограмин А. Структурные данные указывают, что этот класс антибиотиков должен препятствовать эффективному связыванию тРНК с А-сайтом, и, возможно, с Р-сайтом. В таком случае не должна происходить инициация трансляции, а, следовательно, и индукция репортера. Это противоречие было разрешено в ходе данной работы на примере мадумицина II, представителя стрептограминов А класса.

В дополнение к почти всем антибиотикам, взаимодействующим с большой субчастицей, индукцию репортерной системы вызывает ингибитор EF-G, фузидовая кислота. При большой концентрации фузидовой кислоты происходит остановка трансляции после первой транслокации, однако, при меньшей концентрации ингибитора становится возможным образование нескольких пептидных связей. Вероятно, в сублетальной концентрации фузидовой кислоты рибосома останавливается как раз в оптимальном для предотвращения терминации транскрипции положении.

Из всех взаимодействующих с большой субчастицей антибиотиков только пурамицин не индуцирует экспрессию репортерного гена. Пурамицин, связываясь в А-сайте, перехватывает на себя пептид, в результате чего происходит обрыв в синтезируемой белке. Такой механизм действия не предполагает остановки рибосом на мРНК, поэтому структуры, препятствующей образованию терминирующей транскрипцию шпильки образоваться не может и уровень мРНК репортерного гена не повышается.

Многие антибиотики, связывающиеся с малой субчастицей, также вызывают индукцию основанного на аттенуации репортера. Тетрациклин, взаимодействующий с 30S субчастицей и препятствующий связыванию тРНК с А-сайтом, также может быть детектирован при помощи плазмиды pDualrep2. По всей видимости, этот антибиотик может связываться по ходу трансляции и останавливать рибосому, которая уже продвинулась на несколько кодонов по мРНК.

Для аминогликозидов описаны два механизма действия – увеличение числа ошибок, которое не должно замедлять продвижение рибосомы по мРНК, и подавление транслокации, в результате чего рибосома медленнее движется по мРНК, и должна происходить индукция экспрессии гена *Katushka2S*. Протестированные аминогликозиды, такие как канамицин, неомицин, гентамицин и тобрамицин, а также похожий на них по структуре и механизму действия стрептомицин, очень слабо или совсем не индуцируют экспрессию репортерного гена. В то же время, похожие на аминогликозиды гигромицин Б и спектиномицин препятствуют транслокации, не влияя на точность трансляции. Вероятно именно поэтому эти антибиотики вызывают индукцию репортера. Возможно, в случае классических аминогликозидов гибель клеток от ошибок при синтезе белка наступает раньше, чем достигается концентрация, необходимая для эффективного ингибирования транслокации. Таким образом, разработанную репортерную систему можно рассматривать как еще один инструмент в арсенале изучения механизма действия ингибиторов синтеза белка. В отличие от большинства методов, которые используются для характеристики и определения механизма действия рибосомных антибиотиков, наша репортерная

конструкция активируется при сублетальной концентрации ингибитора, когда его количества еще недостаточно, чтобы подавить трансляцию целиком, но тем не менее, антибиотик уже влияет на клетку. В таком случае аппарат синтеза белка изучается в состоянии, наиболее близком к тому, которое происходит в природе при контакте живой бактерии с антибиотиком. На примере аминогликозидов видно, как реакция репортерной системы на разные антибиотики отражает различия в механизмах действия.

Эффективность использования промотора гена *sulA* для детектирования веществ, повреждающих ДНК, уже была показана ранее. В нашей работе впервые в сочетании с промотором *sulA* был использован ген белка TurboRFP. Этот белок предпочтительнее GFP, поскольку спектральная область его флуоресценции меньше перекрывается с областью интенсивной фоновой флуоресценции компонентов бактериальной питательной среды. Возможность определять сразу два механизма действия в одном эксперименте вдвое сокращает время и затраты, особенно при анализе большого числа образцов. Присутствие двух разных сигнальных систем в одной клетке удобно еще и потому, что каждая из них выступает в качестве контроля для другой. Повышение уровня экспрессии одного из сигнальных генов, при том, что другой снижается или не меняется, указывает на специфичность воздействия.

Синтетические ингибиторы гиразы, фермента, необходимого для внесения или снятия сверхспирализации в бактериальной ДНК, такие как налидиксовая кислота, фторхинолоны (левофлоксацин и цiproфлоксацин), этопозид, а также природные, например, микроцин В17, как и ожидалось, вызывают сильную индукцию экспрессии репортерного гена TurboRFP. Сульфаниламиды, ингибиторы биосинтеза нуклеиновых кислот за счет нарушений в синтезе ДНК также индуцируют SOS-ответ и могут быть обнаружены при помощи нашей системы. Таким образом, конструкция pDualrep2 позволяет эффективно обнаруживать и определять механизм действия ингибиторов синтеза белка и индукторов SOS-ответа. Антибиотики, действующие по другим механизмам, такие как ванкомицин (данные не приведены), полимиксин или фурагин, как и ожидалось, индукции ни одного из репортерных генов не вызывают. Тем не менее, их антибактериальную активность можно оценить по размеру зоны ингибирования, а значит все достоинства классического подхода отбора веществ по выявлению антибактериальных свойств методом диффузии в агаре сохраняются и в нашей системе. Простота, низкая себестоимость и быстрота эксперимента позволяет легко использовать созданную систему при высокопроизводительном поиске новых антибиотиков. Полученная плазмида pDualrep2 и способ ее использования для поиска новых антибиотиков запатентованы: патент №2620074

«Рекомбинантная плазмидная ДНК pDualrep2 и штамм, трансформированный ею для выявления веществ и смесей, ингибирующих биосинтез белка и/или вызывающих SOS-ответ».

## 2. Мадумицин II подавляет синтез белка, нарушая положение 3'-концов тРНК.

### 2.1. Стрептограмины А индуцируют репортерную систему pDualrep2.

При разработке системы определения механизма действия был протестирован широкий набор известных антибиотиков, нарушающих синтез белка, в том числе стрептограмины – гризеоовирин (стрептограмин А) и этамицин А (стрептограмин Б). Этамицин А вызвал заметную индукцию репортерного гена, реагирующего на замедление синтеза белка. Индукция экспрессии гена *Katushka2S* гризеоовирином была довольно слабой, что также согласуется с имеющимися структурными данными, стрептограмины А, связываются в ПТЦ, перекрываясь с тРНК и в А-, и Р-сайте. Исходя из такого места связывания, они должны скорее препятствовать инициации, а не снижать скорость трансляцию.

Однако, в ходе широкомасштабного скрининга природных соединений, полученных от компании «InterBioScreen», а также в результате анализа и очистки культуральных жидкостей стрептомицетов, полученных из Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (лаборатория под руководством Ефременковой О.В.) мы обнаружили еще несколько стрептограмин А, таких, как пристинамицин ПА, пристинамицин ПБ и мадумицин II, которые более значительно индуцировали экспрессию гена *Katushka2S* (рис. 6).

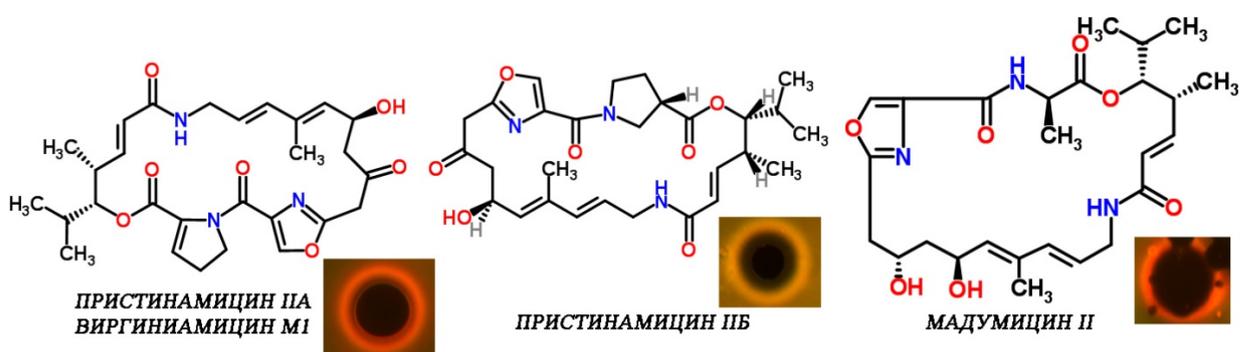


Рисунок 6. Структура стрептограмин А пристинамицина ПА, пристинамицина ПБ и мадумицина II, а также реакция репортерной конструкции pDualrep2 на эти антибиотики.

Мы решили подробно изучить механизм действия этого класса антибиотиков на примере самого просто из них – мадумицина II.

## **2.2. Мадумицин II подавляет синтез белка, препятствуя образованию первой пептидной связи.**

Как и ожидалось, мадумицин II эффективно подавляет трансляцию в бесклеточной системе, при этом концентрация полу-ингибирования составляет  $0,3 \pm 0,03 \mu\text{M}$ . При концентрации  $5 \mu\text{M}$  трансляция подавляется более чем в 100 раз. К ингибированию трансляции могут приводить нарушения на различных стадиях синтеза белка, поэтому мы решили выяснить, какую стадию трансляции нарушает мадумицин II.

Метод тоепринтинга хорошо подходит для определения механизма действия антибиотика. Он позволяет с точностью до нуклеотида определить местоположение рибосомы на мРНК. После проведения синтеза белка в бесклеточной системе к реакционной смеси добавляют ДНК-олигонуклеотид, комплементарный участку мРНК, расположенному через 100-200 нуклеотидов после стартового кодона, и обратную транскриптазу. Она будет синтезировать цепь ДНК пока не встретит остановленную антибиотиком рибосому. Размер синтезированного продукта позволяет определить место положение рибосомы на мРНК с учетом того, что остановка обратной транскрипции из-за размера рибосомы происходит на расстоянии 15-17 нуклеотидов от кодона, находящегося в Р-сайте.

Для проведения тоепринтинга нами выбрана мРНК гена *osmC*, так как для этой мРНК в литературе известны кодоны, на которых происходит остановка рибосомы при обработке различными ингибиторами синтеза белка. Нами протестированы несколько концентраций мадумицина II, ингибирующая на 100% ( $50 \mu\text{M}$ ), заметно подавляющая ( $5 \mu\text{M}$ ) и близкая к  $IC_{50}$  ( $0,5 \mu\text{M}$ ). В контрольную реакцию не добавляли никакого антибиотика. В этом случае не ожидается остановки трансляции и наблюдаемые укороченные продукты обратной транскрипции могут появляться или в результате аминокислот-зависимых пауз в трансляции, или же из-за особенностей вторичной структуры мРНК, которые также могут влиять на эффективность обратной транскрипции (рис. 7). Для того, чтобы определить положение рибосомы на стартовом кодоне, использовался антибиотик тиострептон, препятствующий первой транслокации.

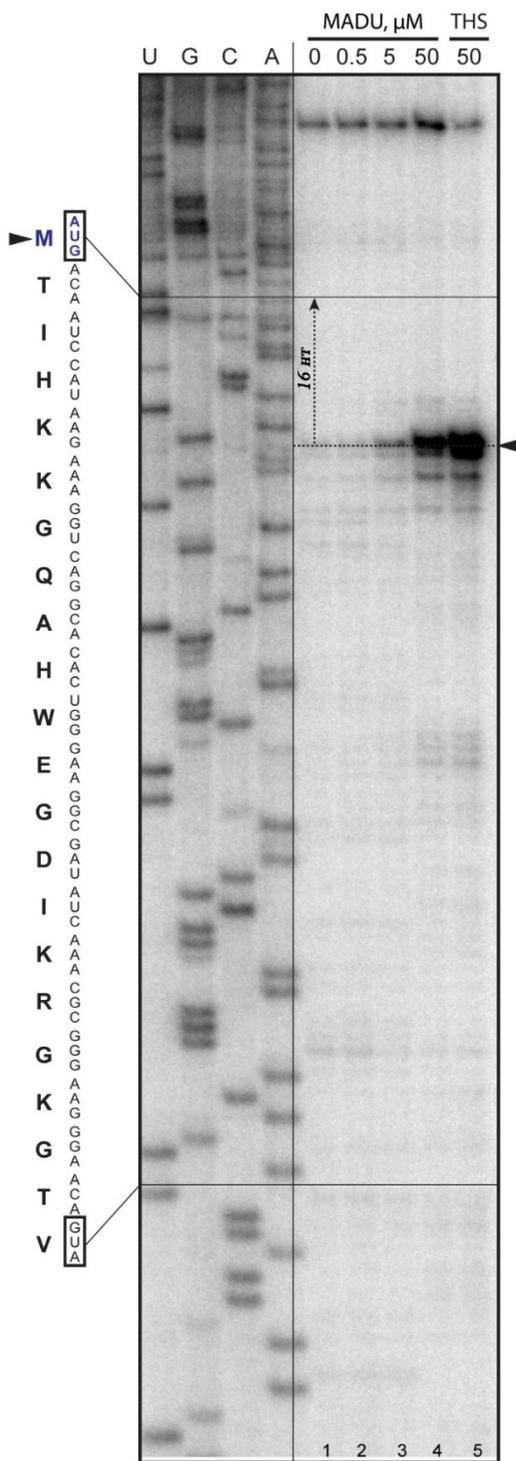


Рисунок 7.

Продукты обратной транскрипции, полученные в ходе тоепринтинга и разделенные в 6% полиакриламидном денатурирующем геле. U, G, C, A – результаты секвенирования последовательности гена *osmC* при помощи того же олигонуклеотида, что используется для обратной транскрипции и четырех дидезокси нуклеотидов. Дорожки 1-4 соответствуют тоепринтингу на мРНК *osmC* в присутствии повышающейся концентрации мадумицина II (MADU 0, 0,5, 5 и 50  $\mu\text{M}$ ), 5 дорожка – тоепринтинг в присутствии тиострептона (остановка на AUG в Р-сайте). Приведена аминокислотная и нуклеотидная последовательность мРНК. Место остановки рибосомы отмечено черным треугольником. Вертикальная пунктирная линия отмечает разницу в 16 нт между остановкой ОТ и кодоном в Р-сайте.

Мадумицин II останавливает синтез белка на первом кодоне, причем при повышении концентрации антибиотика количество рибосом с AUG кодоном в Р-сайте возрастает. Если бы мадумицин II препятствовал связыванию инициаторной тРНК в Р-сайте, мы бы наблюдали отсутствие сигнала, соответствующего рибосоме, остановленной на AUG, так как обратная транскриптаза по мРНК свободной от рибосом синтезировала бы продукт, пока не достигла бы 5'-конца мРНК. Однако из этих данных нельзя определить, влияет ли мадумицин II на перенос аминокислоты или же на связывание aa-тРНК в А-сайте. Полученные ранее структурные данные о положении стрептограминов А в

рибосоме предполагали, что данные антибиотики могут препятствовать связыванию тРНК и с Р- и с А-сайтом. Эксперименты по тоепринтингу продемонстрировали, что связывание инициаторной тРНК с Р-сайтом возможно. Для того, чтобы ответить на вопрос о возможности одновременного связывания и тРНК в А-сайте и мадумицина II, нами использовался метод рентгеноструктурного анализа комплекса 70S рибосом *Thermus thermophilus*, мРНК и трех деацилированных тРНК в А-, Р- и Е-сайтах.

### 2.3. Структура комплекса рибосома-мадумицин II

Структура комплекса определена с высоким разрешением – 2.8 Å. Был обнаружен единственный сайт связывания антибиотика, располагающийся в пептидил-трансферазном центре большой субчастицы (рис. 8А). Полученные сведения о расположении антибиотика хорошо согласуются с имеющимися данными для комплексов рибосомы *E. coli* без лигандов с пролин-содержащими стрептограминами класса А виргиниамицином М, далфопристином и флопристином. В полученной нами структуре электронная плотность, соответствующая ССА-концу А-сайтовой тРНК, не видна (рис. 8Б), при этом остальная часть А-сайтовой тРНК присутствует, т.е. связывание мадумицина II вызывает повышение подвижности 3'конца А-сайтовой тРНК. Присутствие антибиотика не ингибирует связывание тРНК как таковой, при этом расположение остальной части тРНК практически не отличается от наблюдаемой в структуре без антибиотиков (рис. 8).

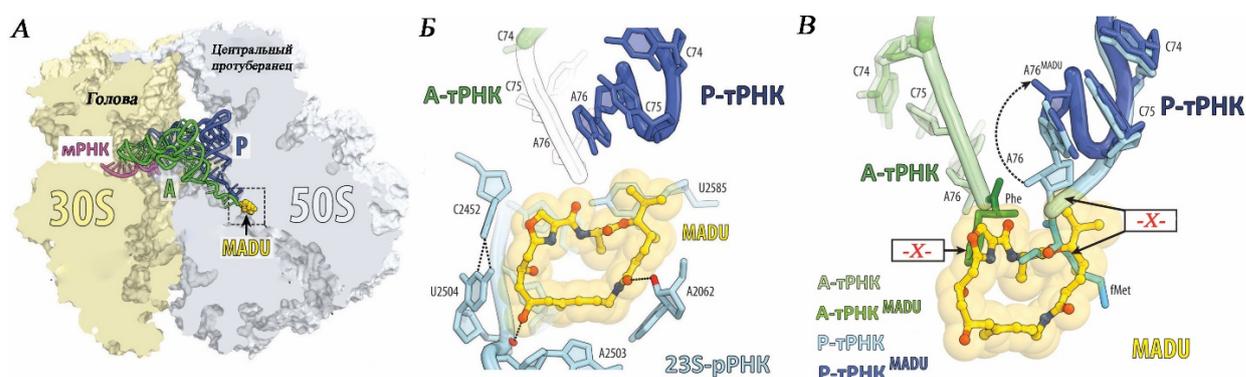


Рисунок 8. Структура комплекса 70S рибосомы с мадумицином II (MADU) и А- и Р-сайтовыми тРНК. А. Общий вид сайта связывания мадумицина II (желтый) в 70S рибосоме *T. thermophilus*, 30S – светло-жёлтая, 50S – светло-синяя, мРНК – фуксин, А- и Р-сайтовая тРНК зеленая и синяя, соответственно. Б. Сайт связывания мадумицина II, нуклеотиды С75 и А76 в А-сайтовой тРНК показаны черным контуром, чтобы подчеркнуть, что это часть тРНК не видна в структуре при связывании мадумицина II. В Сравнение положения ССА-концов А- и Р-сайтовых тРНК в присутствии мадумицина II (зеленая и тёмно-синяя, соответственно) и свободных, прошедших аккомодацию тРНК, А-сайтовая тРНК (светло-зеленая, а групп Phe – темно-зеленая) и Р-сайтовая тРНК (светло-синяя, fMet – синяя). В присутствии мадумицина II правильное позиционирование тРНК невозможно из-за стерических затруднений (отмечены красными буквами X). А76 Р-сайтовой тРНК выворачивается на 180° и больше не может взаимодействовать с А2451 и А-сайтовым субстратом.

Антибиотик образует сразу несколько контактов с рРНК. Как и все остальные стрептограминны А он взаимодействует с А2062. Также возможен контакт с сахаро-фосфатным остовом между нуклеотидами U2504 и А2503, а оксазольное кольцо мадумицина II образует стекинг взаимодействие с А2451.

Все полученные ранее структуры стрептограминов с рибосомой не содержали тРНК, поэтому особенный интерес вызывало изучение влияния мадумицина II на положение тРНК в Р- и А-сайтах. Наиболее заметное изменение конформации, вызванное связыванием мадумицина II наблюдается для нуклеотида А76 Р-сайтовой тРНК, который поворачивается на 180° от своего нормального положения (рис. 8В). Стоит отметить, что при РСА использовались деацилированные тРНК, однако, моделирование положения формилметионина показало, что наблюдаемая конформация совместима и с наличием аминокислоты. Такое положение Р-сайтовой тРНК возможно при инициации трансляции в присутствии мадумицина II. В то же время, деацилированная тРНК в природе находится в Р-сайте между реакцией переноса пептида и до транслокации. Возможно, что наблюдаемое изменение положения нуклеотида А76 Р-сайтой тРНК реализуется и в отсутствие антибиотика, как промежуточная стадия транслокации.

Правильное взаиморасположение нуклеофила в А-сайте и карбонильного углерода в Р-сайте абсолютно необходимо для того, чтобы произошло образование пептидной связи. Мадумицин II нарушает положение ССА-концов А-сайтовой и Р-сайтовой тРНК. Это объясняет почему стрептограмины А, и мадумицин II в частности, ингибируют образование пептидной связи. При этом конформация всей молекулы тРНК, как в А-сайте, так и в Р-сайте, за исключением ССА-конца А-сайтовой и А76 Р-сайтовой тРНК не меняется в присутствии мадумицина II. Полученные структурные данные указывают на то, что механизм действия стрептограминов А более сложен, чем предполагалось ранее. Они не препятствуют связыванию тРНК, но не дают их ССА-концам, несущим аминокислоты, занять правильное положение для образования пептидной связи.

#### **2.4. Мадумицин II вызывает конформационные изменения в ПТЦ**

Мадумицин II взаимодействует сразу с несколькими консервативными нуклеотидами рРНК. Оксозольное кольцо антибиотика находится в стекинге с А2451 23S рРНК, стекинг-взаимодействия образуются также между С6-амидной группой и нуклеотидом А2062 23S рРНК. Интересно, что А2062 поворачивается на 90° при связывании антибиотика. Похожие взаимодействия между другими стрептограммами А и свободными от тРНК рибосомами *Haloarcula marismortui* и *E.coli* были обнаружены ранее.

Связывание мадумицина II вызывает значительные изменения в положении нуклеотидов U2506 и 2585 23S рРНК. U2506 поворачивается более чем на 90° от связанного антибиотика в сторону G2583, с которым образует Вобл-пару. U2585 сдвигается в сторону антибиотика, образуя стекинг-взаимодействия с С1-С2 атомами.

Обратные изменения наблюдались на 50S *H. marismortui* при переходе из неактивного в активное состояние пептидил-трансферазного центра (ПТЦ). Предполагалось, что разрушение U2506-G2583 Вобл-пары приводит к активации ПТЦ (рис. 9А).

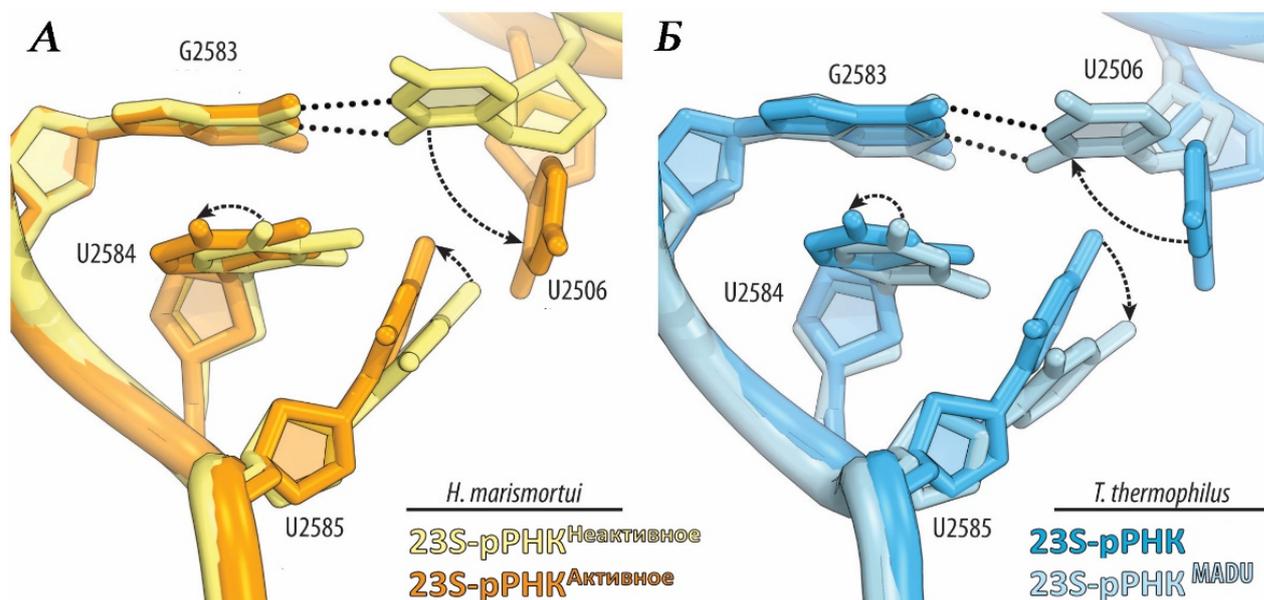


Рисунок 9. Сравнение структурных различий в ПТЦ 50S *H. marismortui* и 70S *T. thermophilus*. А. Наложение структуры 50S рибосомных РНК *H. marismortui* в двух положениях: неактивное (светло-желтое) и активное (оранжевое). При активации ПТЦ происходит разрушение U2506-G2583 Вобл-пары и поворот U2584 и U2585 от ПТЦ (отмечено пунктирными линиями). Б. Наложение структуры 70S рибосом *T. thermophilus* в присутствии (светло-голубой) и отсутствии (голубой) мадумицина II. Связывание мадумицина II приводит к образованию пары U2506-G2583 и сдвигу U2584, U2585 в сторону антибиотиков, т.е. движение противоположное тому, что наблюдается при активации ПТЦ.

Сравнение структуры ПТЦ рибосомы *T. thermophilus* в присутствии мадумицина II и без антибиотика со структурой ПТЦ *H. marismortui* в неактивном и активном состоянии (рис. 9Б) позволяет предположить еще один механизм действия стрептограминов А класса. При взаимодействии мадумицина II с рибосомой меняется не только расположение 3'-концов тРНК, но и нескольких нуклеотидов ПТЦ. Стоит отметить, что в сделанных ранее структурных работах, образование пары U2506-G2583 и изменение положения U2585 не были определены, а молекул тРНК не было в комплексе, при этом положение самого антибиотика во всех сделанных работах одинаковое. Возможно наблюдаемые различия в положении 3'-концов тРНК и нуклеотидов в ПТЦ не два независимых события, а связанные конформационные изменения. Связывание мадумицина II препятствует правильному позиционированию ССА конца А-сайтовой тРНК, а А76 Р-сайтовой тРНК вынужден развернуться на 180°. Такое необычное положение А76 Р-сайтовой тРНК ранее было

получено и для рибосомы без антибиотика, а просто с деацилированной тРНК в Р-сайте. Деацилированная тРНК в Р-сайте в обычных условиях означает, что уже произошел перенос пептида и следующей стадией должна быть транслокация. Конформация ПТЦ в этот момент должна быть наименее благоприятной для новой реакции переноса пептида, а образованная пептидная связь должна быть защищена от гидролиза. Образование пары U2506-G2583 и изменения положения U2585 как раз переводят в ПТЦ в такое состояние, так что, возможно, эти перестройки и вызваны изменением положения A76 Р-сайтовой тРНК. Таким образом, подробное изучение механизма действия мадумицина II позволяет предположить наличие передачи сигнала от изменения положения 3'-концевого нуклеотида Р-сайтовой тРНК или ССА-конца А-сайтовой к нуклеотидам, участвующим в пептидил-трансферазной реакции.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что нами охарактеризован механизм действия ингибитора пептидил-трансферазной реакции, мадумицина II, аланин-содержащего стрептограмина А. Полученные данные раскрыли новые детали механизма действия этого класса антибиотиков. Мадумицин II ингибирует работу рибосомы перед образованием первой пептидной связи, препятствуя правильному позиционированию А- и Р-сайтовых тРНК, в результате чего пептидная связь образоваться не может. Впервые обнаружена вызываемая связыванием стрептограмина А перегруппировка нуклеотидов U2506 и U2585 23S рРНК, в результате которой образуется пара U2506-U2583, характерная для неактивного состояния пептидил трансферазного центра. Эти результаты расширяют знания о механизмах ингибирования рибосомы антибиотиками, а также открывают дорогу рациональному дизайну производных природных антибиотиков, которые потенциально могут быть использованы в медицинской практике.

### **3. Клебсазолицин – тиазол-оксазол-модифицированный микроцин, препятствующий выходу синтезируемого пептида из рибосомы.**

#### **3.1. Клебсазолицин – новый ингибитор синтеза белка.**

Тиазол-оксазол-модифицированными микроцинами (ТОММ) называют большой класс синтезируемых рибосомой пептидов, которые подвергаются пострансляционной модификации, включающей в себе циклизацию остатков цистеина, серина и треонина в тиазол и оксазол (метилоксазол) гетероциклы. ТОММы широко распространены в природе. Линейные азол-содержащие пептиды, цианобактины, тиопептиды и ботромицины относятся к группе ТОММов. Самые известные ТОММы – это микроцин Б (ингибитор ДНК гиразы), стрептолизин (гемолитический экзотоксин), тиострептон (ингибитор синтеза белка), трукнамид (имеет противоопухолевую активность) и гоадоспорин (сигнальная

молекула). Аминокислотный состав ТОММов, в отличие от нерибосомных пептидов, ограничен всего двадцатью аминокислотами, однако, возможность образовывать гетероциклы позволяет получать молекулы, обладающие самой разнообразной активностью.

Механизм биосинтеза различных ТОММов имеет общие черты. Ген самого пептида и гены белков, вносящих постраницсионные модификации или отвечающих за транспорт, организованы в кластер. Если ТОММ – это антибиотик, то в кластере присутствует ген, обеспечивающий устойчивость. Ген пептида может быть разделен на две части – лидерная и основная, лидерная необходима для правильного узнавания модифицирующими ферментами и в дальнейшем обычно отрезается. Благодаря схожести кластеров, кодирующих ТОММы, возможно их биоинформатическое предсказание на основе геномных данных, однако, ввиду очень широкого спектра активности различных ТОММов предсказать механизм действия крайне затруднительно. На основе последовательности кластера, кодирующего микроцин Б17 в геноме *E. coli*, в лаборатории К. В. Северинова был проведен поиск ТОММов и предсказано наличие нового кластера в геноме *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae*. Последовательность лидерного и основного пептидов этого ТОММа значительно отличалась от последовательности микроцина Б17, что указывало на возможность другого механизма действия.

Была проведена успешная гетерологическая экспрессия этого кластера в клетках *E.coli* и определена структура его биосинтетического продукта методами ЯМР и масс-спектрометрии. Оказалось, что после удаления лидерной области остается 23 аминокислоты - S1Q2S3P4G5N6C7A8S9C10S11N12I3A14S15A16N17C18T19G20G21L22G23, при этом Cys7, Cys10, Ser13, и Cys18 образуют гетероциклы, а две N-концевые аминокислоты Ser1 и Gln2 образуют шестичленный гетероцикл с амидиновой связью (рис.10Б). Любопытно, что похожая амидиновая связь образуется и в случае ботромицина. Обнаруженный ТОММ был назван клесазолицин, и для него была показана антибактериальная активность на нескольких бактериях, включая *E. coli*.

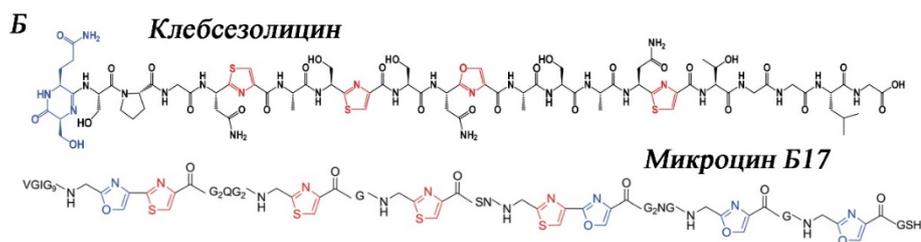
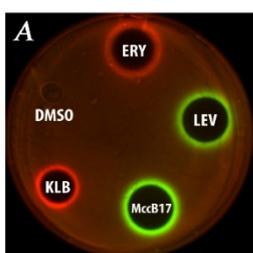


Рисунок 10. А. Использование репортерной конструкции pDualrep2 для определения механизма действия клебсазолицина. На газон клеток штамма  $\Delta\text{tolC}$ -pDualrep2 нанесены следующие растворы по 1 $\mu\text{l}$ : клебсазолицин (KLB) 10мМ, микроцин В17 (MccB17) 10мМ, эритромицин (ERY) 5мМ, левофлоксацин (LEV) 0,1мМ и ДМСО (DMSO), так как все растворы были в ДМСО. Б. Структура клебсазолицина и микроцина В17.

При анализе механизма действия клебсазолицина при помощи репортерной системы pDualrep2, оказалось, что в отличие от микроцина В17, по аналогии с генным кластером которого и был найден клебсазолицин, он вызывает индукцию экспрессии *Katushka2S*, как эритромицин, т.е. это ингибитор синтеза белка, в то время как микроцин В17 индуцирует экспрессию TurboRFP, как и другой ингибитор гиразы – левофлоксацин (рис. 10А). Для подтверждения того, что аппарат трансляции представляет собой основную мишень клебсазолицина, мы использовали бесклеточную систему биосинтеза белка. Клебсазолицин ингибировал синтез люциферазы в S30 экстракте *E.coli*, при этом концентрация, необходимая для подавления реакции наполовину составляла  $0,34 \pm 0,04 \mu\text{M}$ , что соизмеримо с величинами для других действующих на рибосому пептидов, структурно не похожих на клебсазолицин *Ons112* ( $\text{IC}_{50} = 0,15 \mu\text{M}$ ) и *Vac7* ( $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ ).

### 3.2. Рибосома – мишень для действия клебсазолицина.

Большинство ингибиторов синтеза белка напрямую взаимодействует с рибосомой и в первую очередь с нуклеотидами рРНК. Замены нуклеотидов в сайте связывания обычно приводят к возникновению устойчивости. Отбор спонтанных мутаций устойчивости позволяет определить место связывания антибиотика с предполагаемой мишенью. В геноме *E.coli* закодировано семь оперонов рРНК, поэтому нельзя ожидать, что одна и та же спонтанная мутация случится сразу во всех семи, а оценивать и изучать эффект от мутации в части оперонов или же от разных мутаций в нескольких крайне затруднительно. Для решения этой задачи мы решили воспользоваться специализированным штаммом SQ110. В штамме SQ110 шесть рибосомных оперонов были последовательно удалены, таким образом в геноме осталась только одна копия генов рРНК *rrnE*. Несмотря на сниженную скорость роста, такие клетки вполне жизнеспособны, а все рибосомы содержат РНК, полученную в ходе транскрипции одного и того же гена, в случае мутации которого все рибосомы будут содержать одну и ту же мутацию.

При высевании клеток на чашки с концентрацией клебсазолицина в три раза превышающей минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) появились колонии устойчивых к клебсазолицину бактерий. Большинство устойчивых штаммов имели мутации в белках *SbmA* и *OmpF*, участвующих в транспорте пептидов через мембрану. Это указывает на то, что клебсазолицин, вероятно, попадает внутрь клетки за счет активности

этих транспортеров, однако, это мешает отбору мутаций в мишени, на которую он действует. Для того, чтобы отобрать специфические мутации в предполагаемой мишени, рибосоме, нами использовался штамм SQ110, в котором происходила повышенная экспрессия генов *sbmA* и *ompF* с плазмиды. Полученные устойчивые клоны, для которых наблюдалось трехкратное увеличение МИК, содержали замены нуклеотида U2609 23S рРНК на G или A. Этот нуклеотид находится на поверхности туннеля, через который пептид покидает рибосому, а его мутации обеспечивают также устойчивость к кетолидам. Возможно, клебсазолин связывается в том же участке.

Полученные *in vivo* и *in vitro* данные указывают на то, что клебсазолин подавляет трансляцию, взаимодействуя с рибосомным туннелем. Для того, чтобы продемонстрировать это структурными методами, нами получен кристалл рибосомы с антибиотиком и изучен методом РСА. Структура комплекса рибосом *Thermus thermophilus* с клебсазолином, мРНК и тРНК в А-, Р- и Е-сайтах была решена с высоким (2.7 Å) разрешением. В соответствии с результатами случайного мутагенеза место связывания клебсазолина оказалось в туннеле, через который синтезируемый пептид покидает рибосому (рис. 11 А-В). Высокое разрешение, с которым была получена структура комплекса, позволило нам проанализировать взаимодействия клебсазолина с рибосомой на молекулярном уровне. Электронная плотность подтверждает наличие амидинового кольца и азольных циклов в структуре связанного с рибосомой клебсазолина. N-концевой амидиновый цикл образует сразу несколько взаимодействий с консервативными нуклеотидами в пептидил-трансферазном центре. Амидная связь, соединяющая Ser1 и Gln2, включенная в шестичленный амидиновый цикл, образует две водородные связи с U2584, и эти взаимодействия напоминают неканоническую U-U пару (рис. 11 Г). Клебсазолин также вступает в Ван-дер-вальсовы взаимодействия с U2609 23S рРНК, что согласуется с положением мутаций устойчивости. Результаты защиты нуклеотидов от модификации химическими реагентами при связывании клебсазолина (данные приведены в диссертации) также нашли подтверждение в структурных данных. Гидроксильная группа Ser1 взаимодействует с U2585, а Ser9 с U2506. Оба этих нуклеотида защищаются от химической модификации при связывании антибиотика. Взаимодействие клебсазолина с нуклеотидами A2058 и A2059, наблюдаемое в определенной методом РСА структуре, приводит к защите этих нуклеотидов от модификации диметилсульфатом (рис. 11 Д). Несколько стекинг взаимодействий осуществляется между гетероциклами клебсазолина и нуклеотидами 23S рРНК. Например, плоское амидиновое кольцо образует стекинг с C2610, первое и второе тиазольные кольца находятся в стекинге с неканонической парой

C2586-C1782 и A2062-m<sup>2</sup>A2503 парами, соответственно. A2062 – единственный нуклеотид в 23S рРНК, чья конформация заметно меняется при связывании клебсазолицина. Этот нуклеотид поворачивается более чем на 90°, образуя Хугстиновскую пару с m<sup>2</sup>A2503, также, как в присутствии многих других ингибиторов пептидил трансферазного центра. Образование A2062-m<sup>2</sup>A2503 пары согласуется с наблюдаемой защитой A2062 23S рРНК от модификации диметилсульфатом (рис. 11 Е). Последний оксазольный цикл клебсазолицина направляет его С-концевую часть к выходу через пептидный туннель.

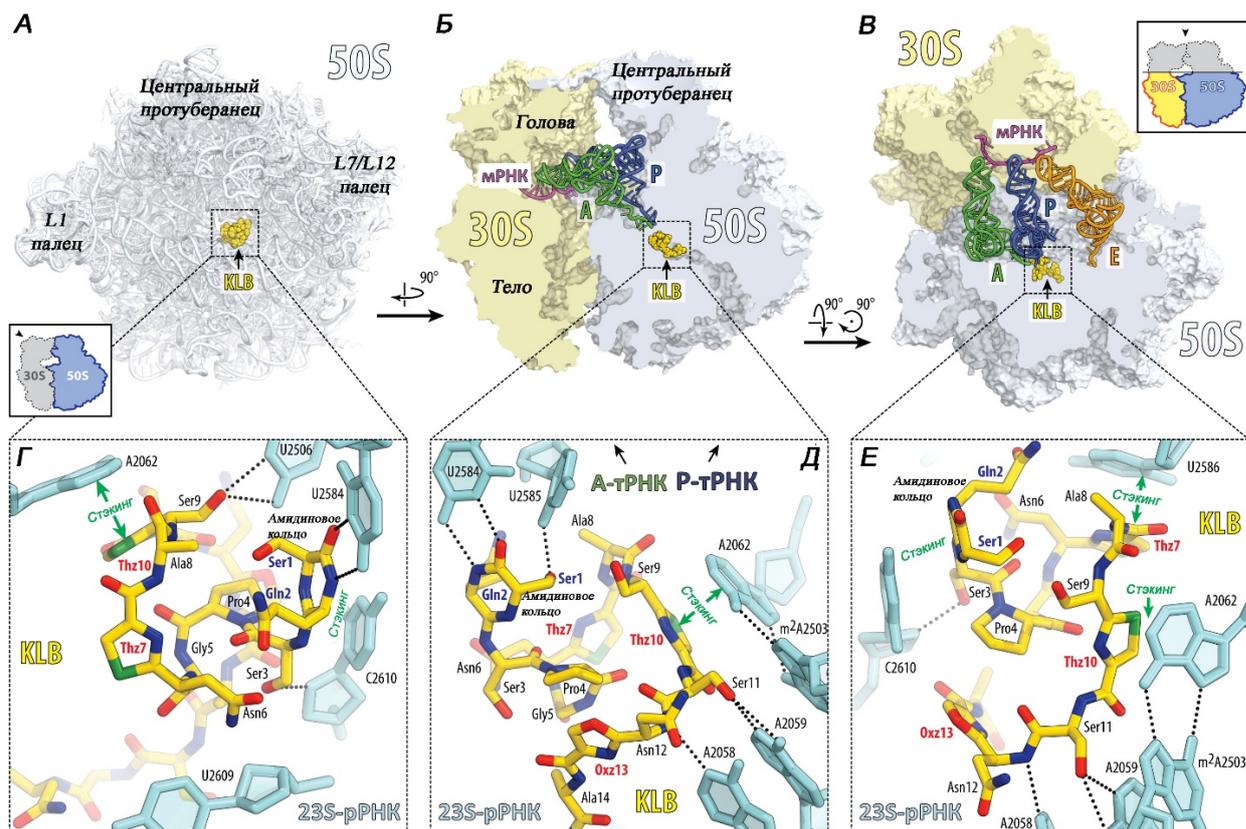


Рисунок 11. Структура комплекса клебсазолицина с 70S рибосомой, тремя тРНК и мРНК. А-В. Общий вид структуры антибиотика (желтый) с 70S рибосомой *T. thermophiles*. 30S – светло-желтая, 50S – светло-синяя, мРНК – фуксин, А-сайтовая тРНК – зеленая, Р-сайтовая – темно-синяя, Е-сайтовая – оранжевая. Г-Е. Сайт связывания клебсазолицина и взаимодействия, образуемые антибиотиком с нуклеотидами 23S рРНК, возможные водородные связи отмечены пунктирными линиями.

Таким образом, клебсазолицин связывается в туннеле, через который пептид покидает рибосому, и ингибирует синтез белка. Несколько различных классов рибосомных антибиотиков связываются в этом же участке. Наложение структуры клебсазолицина в комплексе с рибосомой на известные структуры макролидов показывает, что их сайты связывания сильно перекрываются. Однако, макролиды не закрывают туннель целиком. Связываясь с одной его стороны, они значительно сужают его, хотя многие пептиды могли бы пройти через туннель даже в их присутствии. В отличие от маленького и компактного

эритромицина большая молекула клебсазолицина сворачивается в туннеле и перекрывает большую его часть. Сайт связывания клебсазолицина также перекрывается с местом связывания стрептограминов Б класса. Первое и второе тиазольные кольца клебсазолицина образуют стеклинг взаимодействия с теми же самыми нуклеотидами, что и амид и 3-гидроксипиколиновая кислота квинупристина, представителя стрептограминов Б класса. Структурное сравнение комплексов рибосомы с антибиотиками, связывающимися в пептидном туннеле, показывает, что одни и те же элементы рибосомы могут принимать участие во взаимодействии с разными, химически непохожими ингибиторами.

### **3.3. Клебсазолицин препятствует продвижению рибосомы по мРНК**

Полученные структурные данные позволяют предположить, что клебсазолицин подобно макролидам и стрептограминам Б должен блокировать продвижение пептида по туннелю. Поскольку, положение А-сайтовой и Р-сайтовой тРНК практически никак не меняется в присутствии клебсазолицина, поэтому ни инициация трансляции, ни даже образование первой пептидной связи никак не должно быть затронуто этим антибиотиком. Самое заметное изменение в рРНК, поворот A2062, также происходит при связывании макролидов и стрептограминов Б.

Для того, чтобы определить, какая именно стадия трансляции подавляется клебсазолицином, нами использовался метод тоепринтинга. Для мРНК гена *osmC* известны положения остановки трансляции для широкого набора антибиотиков, поэтому при сравнении наших данных с литературными нами выбрана именно эта матрица (рис. 12).

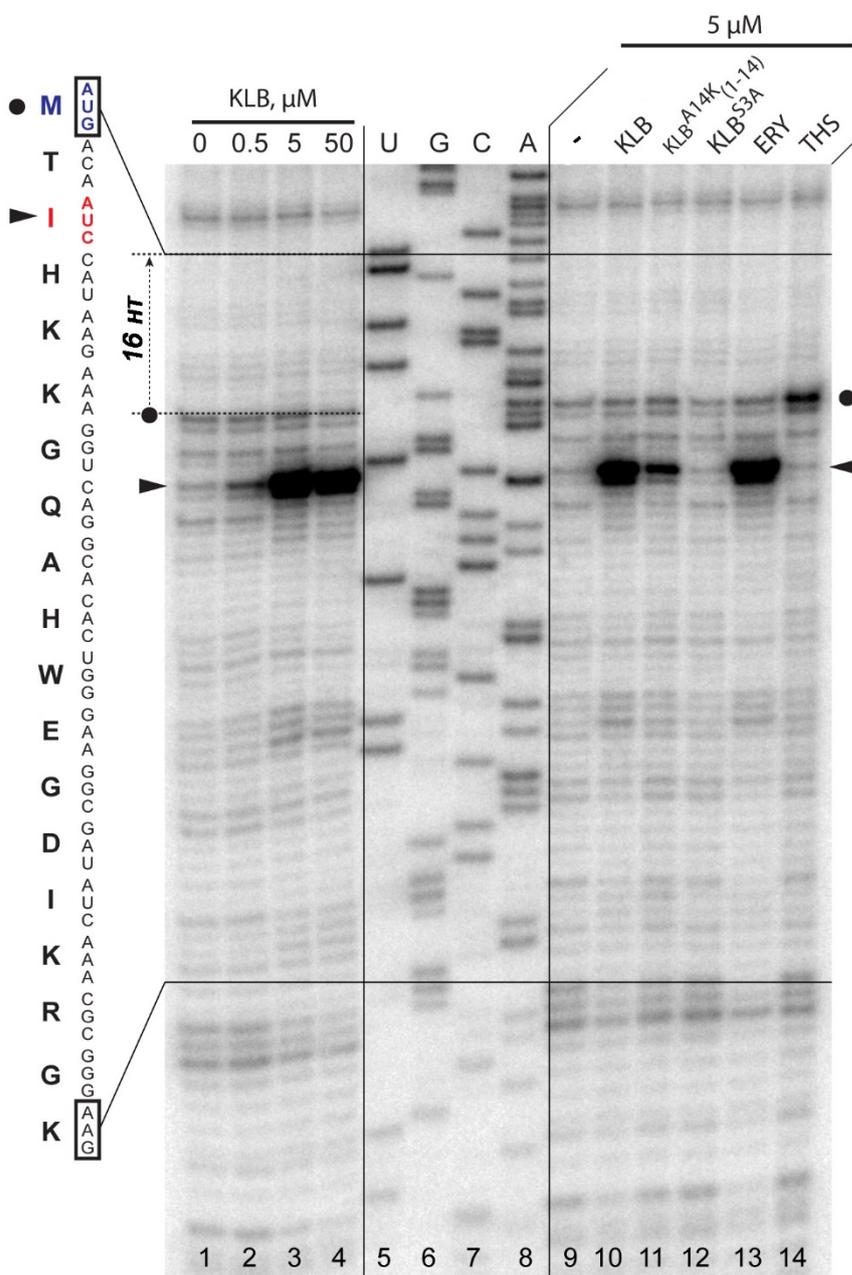


Рисунок. 12 Остановка рибосом на мРНК *osmC* определенная при помощи тоепринтинга. Приведено секвенирование соответствующего участка гена *osmC* (U, G, C и A). Черный круг указывает на остановку на стартовом кодоне (синий AUG), черный треугольник указывает на остановку на AUC (Ple) кодоне (красный). KLB – клебсазолицин, KLB<sup>A14K(1-14)</sup> – укороченный KLB, KLB<sup>S3A</sup> – замена S3 на A THS – тиострептон, ERY – эритромицин.

Тиострептон (14) и эритромицин (13) использовали в качестве контрольных антибиотиков, подавляющих первый шаг трансляции или ее продвижение,

соответственно. Видно, что повышение концентрации клебсазолицина приводит к остановке рибосомы на третьем кодоне (дорожки 1-4), Клебсазолицин подавляет продвижение рибосомы по мРНК сходным с эритромицином образом, при этом не имея ничего общего в структуре с самым известным представителем макролидов. Похожий сайт связывания и одинаковое воздействие на положение A2062, по всей видимости, обуславливает общий механизм действия. Схожее место связывания обеспечивает схожесть результатов тоепринтинга в присутствии клебсазолицина и стрептограминов Б. Следовательно, независимо от природы молекулы, которая блокирует туннель, место связывания и контакты с рибосомой определяют длину пептида, который может быть синтезирован в присутствии антибиотика.

Укороченный вариант клебсазолицина KLBA14K (1-14), содержащий три из четырех тиазол/оксазольных циклов, полученный при помощи замены 14 аланина на лизин и последующего разрезания трипсином, вызывает остановку рибосомы в том же положении, что и полноразмерный KLB (дорожки 10 и 11). Сигнал для KLBA14K (1-14) немного слабее, возможно, эффективность его связывания все-таки ниже, чем у исходного клебсазолицина, но количество кодонов, на которое в присутствии антибиотика может продвинуться рибосома, а значит и механизм действия, одинаковые. При этом укороченный вариант KLBA14K (1-14) полностью лишен способности подавлять рост бактериальных клеток. При замене третьего серина на аланин (KLBS3A) больше не образуется N-амидиновое кольцо. Такой мутантный вариант лишен активности по отношению к бактериальным клеткам и не ингибирует синтез люциферазы в бесклеточной системе. В эксперименте по тоепринтингу KLB3SA не вызывает остановки рибосомы на мРНК (дорожка 12), еще раз подтверждая необходимость N-концевого амидинового кольца для активности.

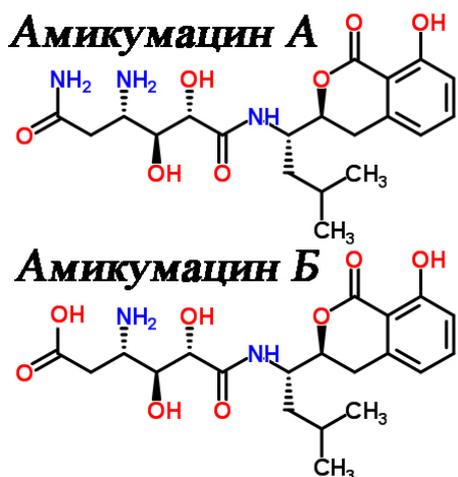
Таким образом, клебсазолицин – первый линейный азол-содержащий пептид, для которого структурно изучены мишень и механизм действия. Клебсазолицин – уникальный тиазол/оксазольный пептид, который ингибирует синтез белка, связываясь в туннеле, через который пептид выходит из рибосомы. Он связывается в свернутой конформации и блокирует элонгацию после присоединения нескольких аминокислот. Уникальное и необходимое амидиновое кольцо клебсазолицина образует сразу несколько связей с консервативными нуклеотидами 23S рРНК. Антибиотик состоит из двух частей: 14-членный N-конец необходим для ингибирования синтеза белка, в то время как 9-членный C-конец необходим для импорта клебсазолицина в клетку. Модульная структура антибиотика открывает путь к созданию специфических лекарственных препаратов, обладающих селективностью по отношению к различным бактериям.

#### **4. Амикумацин А – новый ингибитор синтеза белка, нарушающий транслокацию.**

##### **4.1. Штамм *Bacillus pumilus* продуцирует антибиотик амикумацин А.**

При анализе большого числа образцов культуральных жидкостей разнообразных почвенных микроорганизмов, предоставленных нам НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (лаборатория Ефременковой О.В.) нами обнаружена антибактериальная активность в образце «4080» штамм *Bacillus pumilus*, ассоциированная с нарушением трансляции. Очистка и анализ активных компонентов показал, что вещество, подавляющее трансляцию, это антибиотики амикумацин А. При 37°C он легко подвергается

гидролизу, с превращением в амикумацин Б, не обладающий антибактериальной активностью не обладает (рис. 13).



Антибактериальная активность амикумацина А была впервые показана более тридцати лет назад. Амикумацин А продуцируется несколькими видами бактерий, обитающими как в почве, так и в морской воде. Он проявляет активность против целого ряда патогенных бактерий, включая *Helicobacter pylori* и метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus*. Механизм действия амикумацина А оставался неизвестным до настоящего исследования.

Рисунок 13. Структура амикумацинов А и Б.

Активация нашей репортерной конструкции, основанной на торможении синтеза модифицированного лидерного пептида TrpL, указывала, что аппарат трансляции представляет самую вероятную мишень амикумацина А. Для подтверждения такого предположения, мы проверили способность данного антибиотика подавлять синтез белка в бесклеточной системе. Оказалось, что амикумацин А подавляет трансляцию зависимым от концентрации образом. При концентрации 1  $\mu\text{M}$  амикумацин А, как и эритромицин, полностью подавляет синтез белка, а амикумацин Б практически не ингибирует синтез белка даже при 10  $\mu\text{M}$ . Амикумацин Б отличается от А заменой амидной группы на карбоксильную, это делает антибиотик неактивным как *in vivo*, так и *in vitro*. Это позволяет предположить, что амидная группа участвует во взаимодействии с мишенью. При помощи оптимизации условий культивирования штамма продуцента удалось добиться того, чтобы основным продуктом биосинтеза был именно амикумацин А. Результаты этой работы запатентованы: патент №2627187 «Штамм *Bacillus pumilus* и способ получения антибиотика амикумацина А с его применением».

Как и в случае с клебсазолицином, нами проведен отбор штаммов с мутациями в рРНК, которые дают устойчивость к амикумацину А. Определение МИК полученных штаммов показало, что мутация нуклеотидов 16S рРНК малой субчастицы рибосомы С795U в 128 раз увеличивает МИК, в то время как мутация А794G дает еще большую устойчивость.

## 4.2. Амикумадин А связывается в E-сайте малой 30S субчастицы рибосомы.

Биохимические и генетические эксперименты указывают на то, что амикумадин А нарушает трансляцию за счет взаимодействия с рибосомой. Для изучения места связывания нового антибиотика с рибосомой мы использовали рентгеноструктурный анализ. Взаимодействие антибиотика с рибосомой изучалось как для мадумицина II и клебсазолицина на модели 70S рибосомы *T. thermophilus* в комплексе с тремя тРНК и мРНК. В виду того, что амикумадин А не очень стабилен в растворе, для кристаллизации выбран способ «вымачивания» полученных кристаллов 70S рибосомы, с тРНК и мРНК в 250μМ растворе амикумадина А. Стабилизирующий эффект амикумадина А позволил получить структуру бактериальной рибосомы с разрешением 2.4Å, что на тот момент было самым высоким разрешением структуры рибосомы с тРНК и мРНК. Оказалось, что амикумадин А связывается с платформой 30S субчастицы, взаимодействуя с 16S рРНК и мРНК (рис. 14 А-В).

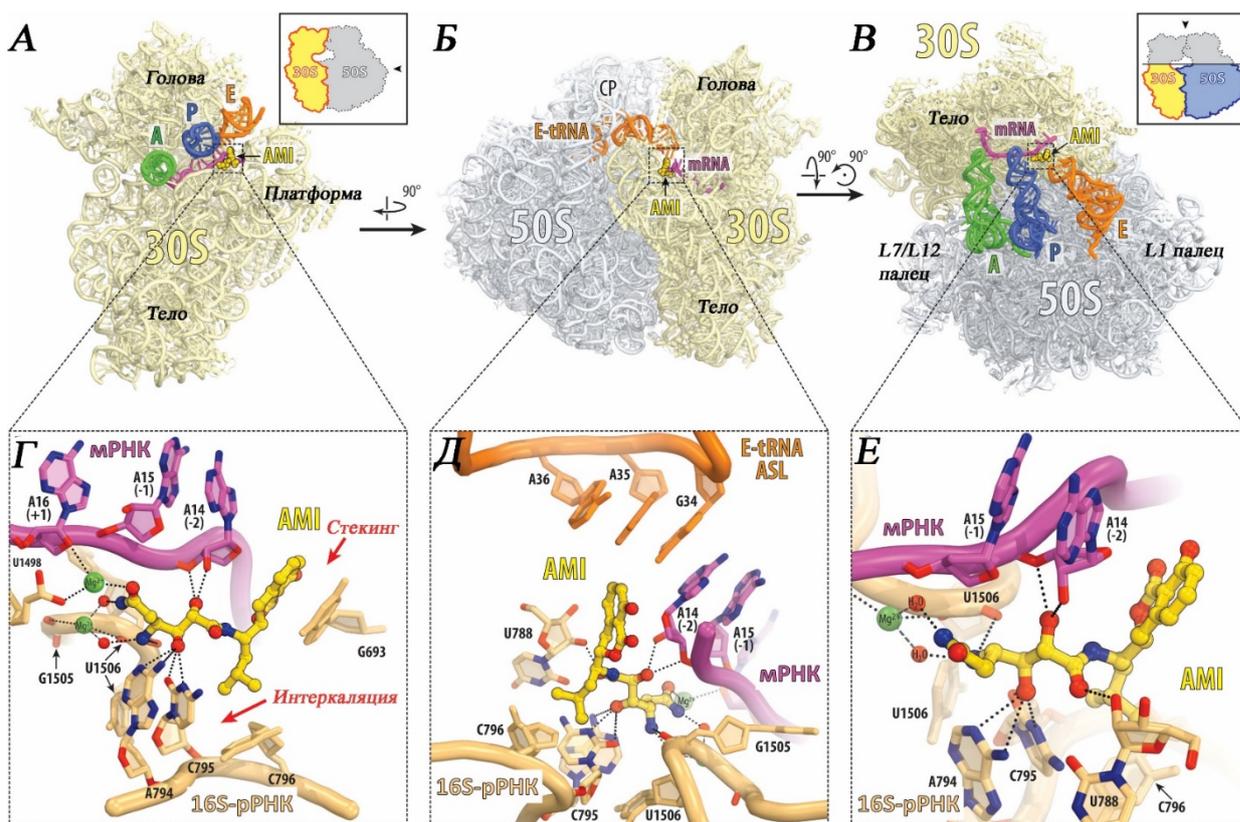


Рисунок 14. Сайт связывания амикумадина А (желтый) с 70S рибосомой *T. thermophilus*, 30S – светло-желтая, 50S – светло-серая, мРНК – фуксин, тРНК – А-сайтовая, зеленая, Р-сайтовая, темно-синяя, Е-сайтовая, оранжевая.

Данные электронной плотности полностью соответствовали химической структуре амикумадина А, который, как оказалось, связывается с малой 30S субчастицей между мРНК

в Е сайте и 16S рРНК. Обнаружен единственный сайт связывания антибиотика в непосредственной близости от нуклеотидов 794 и 795 (рис. 14 Г-Е), замена которых обеспечивает устойчивость. Можно полагать, что амикумадин А в клетках связывается аналогичным образом.

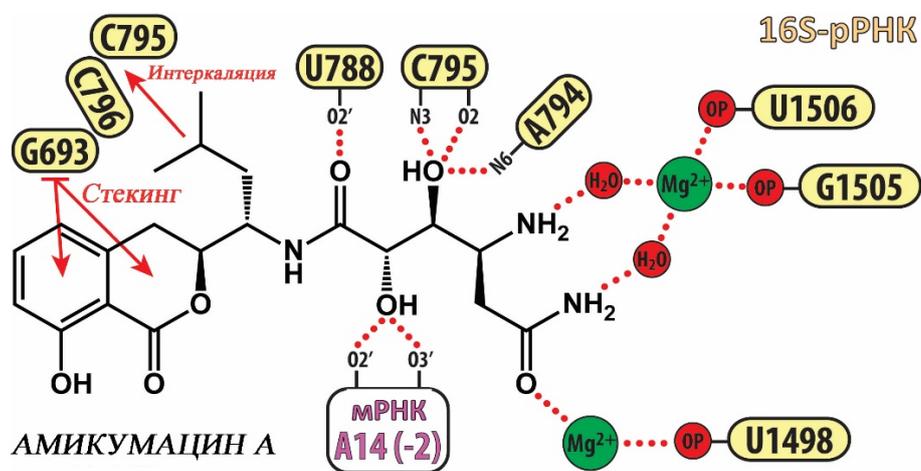


Рисунок 15. Схема взаимодействия амикумацина А с мРНК и 16S рРНК.

Длинный гидрофильный 2,3-дигидрокси-5-аминогександиаמידный хвост амикумацина А образует сеть водородных связей с ближайшими консервативными нуклеотидами 16S рРНК – U788, A794 и C795 в петле спирали h24 (рис. 14Г-Е, 15). Концевая амидная группа амикумацина А образует опосредованные ионом магния взаимодействия с фосфатными группами нуклеотидов G1505 и U1506. На другой стороне сайта связывания тот же “хвост” амикумацина А взаимодействует с нуклеотидами – 1 и – 2 (относительно стартового кодона) мРНК, прикрепляя Е-сайт кодон мРНК к спирали h24 16S рРНК. Гидрофобный изобутиловый участок амикумацина А интеркалирует между основаниями C795 и C796, в то время как большой, плоский изокумариновый фрагмент взаимодействует за счет  $\pi$ -стекинга с нуклеотидом G693 16S рРНК. Структурные данные объясняют полученные ранее микробиологические результаты: замена A794 на любой другой нуклеотид приведет к потере водородных связей, образуемых экзоциклической амино группой аденина 794 16S рРНК, а амидная группа амикумацина участвует в координации молекул воды вокруг иона магния, обеспечивающего взаимодействие антибиотика с нуклеотидами 1506 и 1505 16S рРНК. Замена амидной на карбоксильную группу в амикумадине Б нарушает эти взаимодействия и делает антибиотик неактивным.

Наблюдаемые данные по распределению электронной плотности позволяют определить взаимодействия, образуемые молекулой антибиотика с рибосомой и мРНК. Благодаря высокому разрешению структуры и присутствию рибосомных лигандов (тРНК и

мРНК) можно предположить следующий механизм действия антибиотика. За счет серии взаимодействий амикумацин А связывается с рибосомой, но в то же время образует связь и с мРНК, т.е. антибиотик «приклеивает» мРНК к 16S рРНК, блокируя необходимое для работы рибосомы движение мРНК относительно малой субчастицы. Хотя амикумацин А связывается в Е-сайте малой субчастицы, он не взаимодействует непосредственно с Е-сайтовой тРНК. Предложенный на основании структурных данных механизм нуждался в подтверждении другими методами.

#### 4.3. Амикумацин А препятствует транслокации.

Подавление синтеза белка может быть результатом нарушения любой из стадий трансляции, начиная от инициации и заканчивая терминацией. Амикумацин А был

обнаружен при помощи разработанной нами репортерной системы, основанной на аттенуации транскрипции модифицированного лидерного пептида триптофанового оперона. Для того, чтобы происходила индукция экспрессии, необходима остановка или замедление трансляции лидерного пептида. В таком случае, Амикумацин А не должен препятствовать инициации трансляции, а скорее замедлять или останавливать элонгацию. Как для мадумицина II и клебсазолицина, мы решили использовать тоепринтинг, как наиболее эффективный метод определения стадии, нарушаемой антибиотиком.

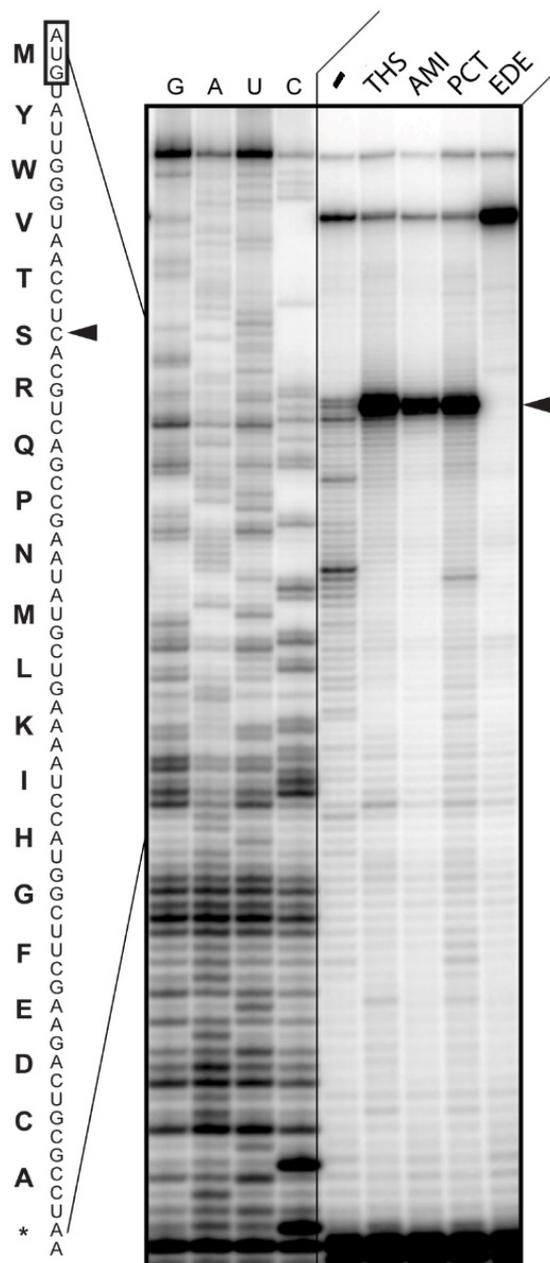


Рисунок 16. Анализ механизма действия амикумацина А (АМІ) при помощи тоепринтинга на мРНК *rst1* (синтетический ген, состоящий из 21 аминокислоты, всех по одной, плюс стартовый кодон). Контрольные эксперименты: без антибиотика (-), тиострептон (THS), пактамицин (PCT) и эдеин (EDE). Черным треугольником отмечен нуклеотид, на котором останавливается обратная транскрипция, в то время как в Р-сайте рибосомы отмечен стартовый кодон (обведен черным квадратом). Приведены данные

секвенирования гена *rst1* и соответствующая аминокислотная последовательность. Концентрации всех антибиотиков 100  $\mu\text{M}$ .

Одновременно с амикумацином А нами протестированы другие антибиотики, связывающихся в том же участке рибосомы, такие как эдеин и пактамицин (рис. 16). В отличие от эдеина, ингибирующего инициацию трансляции (нет сигнала на стартовом кодоне), в случае амикумацина А и пактамицина удается видеть образование инициаторного комплекса, а дальнейшее продвижение рибосомы по мРНК не наблюдается.

В случае проведения аналогичного эксперимента с постепенным снижением концентрации амикумацина А можно наблюдать образование более коротких продуктов обратной транскрипции, т.е. происходит замедленное продвижение рибосомы по мРНК в присутствии антибиотика. Структурные данные не противоречат тому, что амикумацин А может взаимодействовать и с транслирующей рибосомой. В таком случае рибосома может быть остановлена на любом шаге элонгации трансляции.

Остановка продвижения рибосомы по мРНК, вызванная амикумацином А, наблюдаемая при помощи тоепринтинга, может быть результатом нарушения любой стадии элонгации. Расположение амикумацина А в рибосоме позволяет предположить, что этот ингибитор может препятствовать транслокации. За сдвиг рибосомы на один кодон по мРНК после реакции переноса пептида отвечает белок EF-G. В более ранней работе по изучению механизма действия амикумацина А на *Staphylococcus aureus* именно в этой белке были обнаружены мутации устойчивости. Мы решили попробовать получить аналогичные мутации в клетках *E.coli*, используя такой же подход, как и при поиске мутаций устойчивости в рРНК, однако, в этот раз используя штамм дикого типа с семью оперонами рРНК. При этом мы рассчитывали найти мутации устойчивости не в последовательности рРНК.

Для отбора мутаций устойчивости мы использовали штамм *E. coli* *ΔtolC*, клетки которого мы высевали на агаризованную среду с концентрацией амикумацина А 4 мкг/мл, т.е. в 8 раз выше МИК для данного штамма. Через 40 часов инкубации при 37°C появилось несколько устойчивых клонов. Для каждого из устойчивых клонов мы амплифицировали и секвенировали последовательность гена *fusA*, кодирующего EF-G. В четырех из семи устойчивых к амикумацину А штаммах мы обнаружили следующие мутации в последовательности гена *fusA*, в участке, кодирующем четвертый домен: G542V (два клона), G581A (один клон) и инсерцию V544VV. Из этих мутаций, только замена G542V была обнаружена ранее в *S. aureus*. Для того, чтобы подтвердить, что мутаций в IV домене EF-G достаточно для повышения МИК, мутантные варианты *fusA* клонировали в

экспрессионный вектор pCA24N и трансформировали полученными плазмидами штамм *ΔtolC*. Повышенная экспрессия генов мутантных EF-G, даже на фоне экспрессии EF-G дикого типа, оказалось достаточной, чтобы повысить значения МИК в 4-14 раз.

Стоит отметить, что мутации в гене EF-G по сравнению с мутациями в рНК приводят к меньшему повышению МИК. Логично предположить, что замены в рНК препятствуют связыванию антибиотика, а мутации EF-G оказывают влияние на активность фактора транслокации, до некоторой степени компенсирующее влияние амикумацина.

Среди трех устойчивых к действию амикумацина A клонов, не имеющих мутаций в *fusA*, два продемонстрировали повышение устойчивости сразу к нескольким антибиотикам, например, эритромицину и левофлоксацину. Скорее всего, мутации в этих штаммах произошли в генах, связанных с эффективностью проникновения малых молекул, в том числе антибиотиков, в клетку. Возможно, стала более эффективно работать какая-нибудь эффлюкс система. В последнем клоне была обнаружена делеция 14 нуклеотидов Δ424-437 в гене *ksgA*. Такая мутация нарушает рамку считывания и должна инактивировать KsgA метилтрансферазу, а, следовательно, препятствует метилированию A1518/1519, расположенных близко к сайту связывания амикумацина A. Мутация устойчивости за счет инактивации *ksgA* также была ранее показана у *S. aureus*. Для того, чтобы подтвердить связь инактивации *ksgA* с устойчивостью к амикумацину A, мы измерили значение МИК для штамма Δ*ksgA* из коллекции нокаутов *E. coli* и сравнили со значением для штамма BW25113. Удаление гена *ksgA* увеличило МИК в два раза, значит отсутствие метилирования A1518/1519 влияет на активность амикумацина A.

Мы экспрессировали ген EF-G с мутацией G542V в клетках *E. coli* и выделили белок при помощи аффинной хроматографии, а затем проверили возможность противодействовать ингибирующему эффекту амикумацина A при синтезе белка в бесклеточной системе. Добавление мутантной формы EF-G в присутствии EF-G дикого типа привело к трехкратному увеличению синтеза активной люциферазы в присутствии амикумацина A. Мутация G542V, судя по всему, может частично противодействовать ингибирующему эффекту амикумацина *in vivo* и *in vitro*. Интересно, что увеличение концентрации фактора транслокации дикого типа, пусть и незначительно, но тоже снижает эффективность действия амикумацина A. Все эти результаты указывают на то, что этот антибиотик нарушает именно транслокацию.

Для того, чтобы напрямую оценить влияние амикумацина A на транслокацию, мы использовали метод тоепринтинга в системе с индивидуальным добавлением компонентов

аппарата трансляции. В Р-сайте рибосомы заранее была связана деацелированная тРНК<sup>Met</sup>, а в А-сайте N-ацетил-Phe-тРНК<sup>Phe</sup>. Ацелированная аминокислота в А-сайте моделирует дипептид, который должен оказаться на А-сайтовой тРНК после пептидил-трансферазной реакции перед транслокацией. Рибосома в комплексе с такими тРНК представляет собой субстрат для фактора EF-G, по изменению ее положения на мРНК можно будет судить об эффективности транслокации (рис. 17).

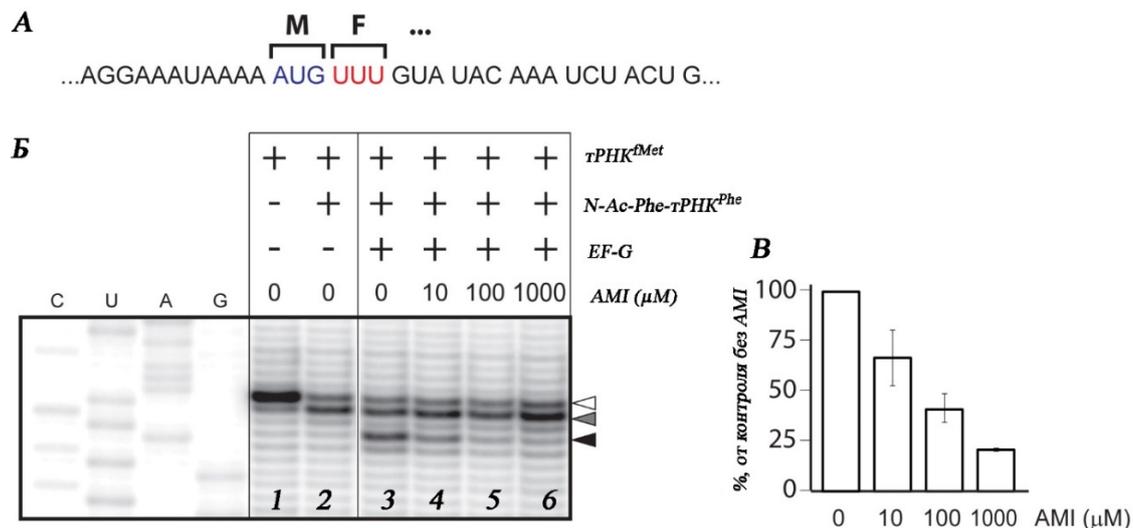


Рисунок 17. Ингибирование транслокации амикумацином А (АМІ) в модельной системе с использованием мРНК гена 32 фага Т4 (А). Транслокация в присутствии EF-G происходит за 30 секунд, без фактора она не происходит вообще (Б). Белый треугольник указывает на положение рибосомы, соответствующее стартовому кодону в Р-сайте, А-сайт пустой, серый треугольник – в А-сайте N-ацетил-Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, черный треугольник – N-ацетил-Phe-тРНК<sup>Phe</sup> в Р-сайте, произошла транслокация. В. Обсчет результатов тоепринтинга, сигнал в отсутствии антибиотика (дорожка 3) принят за 100%.

Для начала транслокации добавляли EF-G в присутствии или отсутствии амикумацина А. В отсутствие N-ацетил-Phe-тРНК<sup>Phe</sup> рибосома находится на стартовом кодоне (дорожка 1), на месте инициаторного кодона связывается деацелированная инициаторная тРНК. Добавление N-ацетил-Phe-тРНК<sup>Phe</sup> приводит к появлению дополнительного сигнала со сдвигом на один нуклеотид, это говорит о связывании такой тРНК в А-сайте (дорожка 2). Это модель состояния, наблюдаемого после образования первой пептидной связи – деацелированная тРНК в Р-сайте, а в А-сайте тРНК с «дипептидом». Добавление EF-G приводит к перемещению рибосомы и, соответственно, появлению продукта обратной транскрипции, который на три нуклеотида короче, чем до добавления EF-G., Это говорит о произошедшей транслокации (дорожка 3), когда рибосома продвинулась на один кодон вперед, а N-ацетил-Phe-тРНК<sup>Phe</sup> перешла в Р-сайт. Повышение концентрации амикумацина А приводило к заметному снижению эффективности перехода

рибосомы с первого на второй кодон (дорожки 4, 5 и 6), окончательно подтверждая, что механизм действия амикумацина А – это подавление транслокации.

Сайт связывания амикумацина в спирали h23 16S рРНК перекрывается с местами связывания таких известных антибиотиков, как пактамицин, касугамицин и эдеин. Результаты тоепринтинга показывают, что пактамицин, также, как амикумацин А, останавливает рибосомы на инициаторном кодоне в бесклеточной системе трансляции. Однако, эти два антибиотика связываются с рибосомой совершенно разными способами. Сравнение полученных нами структур рибосомы с амикумацином А и пактамицином показало, что в отличие от амикумацина А, пактамицин не контактирует ни с А794, ни с G1505. В то время как оба антибиотика располагаются напротив нуклеотида G693, пактамицин занимает значительно больше места, чем амикумацин А благодаря своему второму 6-метилсалициловому ароматическому кольцу. В результате, в отличие от амикумацина А, пактамицин вытесняет мРНК из ее нормального положения в Е-сайте малой субчастицы, нарушая контакты мРНК с Е-сайтовой тРНК, а также с А-сайтовой. С нашими структурными данными согласуется предположением о том, что пактамицин влияет на аккомодацию тРНК в Е-сайте.

В комплексе рибосомы с амикумацином А, в отличие от ее комплекса с пактамицином, конформация мРНК сохраняется в том же состоянии, что и в отсутствии антибиотика. Несмотря на перекрывающиеся сайты связывания, механизмы действия амикумацина А и пактамицина оказываются противоположными: один стабилизирует мРНК в Е-сайте, в то время как другой ее вытесняет.

Два других антибиотика связываются вблизи спирали h24: касугамицин и эдеин. Механизм их действия принципиально отличается от действия амикумацина А. И касугамицин, и эдеин препятствуют связыванию мРНК, перекрываясь с местом расположения кодона в Р-сайте и не дают образоваться инициаторному комплексу, что подтверждается отсутствием остановки рибосомы на стартовом кодоне в тоепринтинге. Перекрывание сайтов связывания химически непохожих антибиотиков может быть использовано для создания новых, более эффективных гибридных антибиотиков. Несколько гидроксильных, амина и амидных групп, которые присутствуют в относительно простой молекуле амикумацина А открывают возможность для внесения модификаций, которые могут улучшить свойства этой молекулы, повысив эффективность и, возможно, придав селективность. Отсутствие ферментов, модифицирующей спираль h24 и тот факт, что только мутации в рРНК, которые в клинической практике встречаются редко, могут обеспечить высокую устойчивость, делает амикумацин А привлекательной молекулой для

медицинской химии. Полученные нами структурные данные о необычном механизме действия нового ингибитора трансляции должны облегчить такую работу.

## 5. Заключение

Рибосома – это молекулярная машина, работа которой основана на функциональных РНК. Именно РНК является основным структурным компонентом нескольких активных центров рибосомы. В декодирующем центре взаимодействуют тРНК и мРНК, при этом рибосома контролирует корректность этого взаимодействия. В пептидил-трансферазном центре пептид, присоединенный к Р-сайтовой тРНК, переходит на аминокислоту А-сайтовой тРНК. Оказавшаяся в А-сайте тРНК с пептидом должна быть транслоцирована в Р-сайт, при этом растущий пептид продвигается по туннелю к выходу из рибосомы. Всего на одном шаге трансляции необходимо согласованное действие большого числа очень крупных молекул, при этом расстояния между функциональными центрами превышает десятки ангстрем. Связывание очень маленькой по сравнению со всеми участниками трансляции молекулы антибиотика может полностью заблокировать синтез белка из-за нарушения только одного процесса. Благодаря небольшим структурным различиям между рибосомами бактерий и эукариот многие антибиотики эффективно подавляют синтез белка в клетках патогенных организмов, не затрагивая работу рибосом в человеческих клетках.

В данной работе предложен подход к направленному поиску новых ингибиторов трансляции, основанный не на структурном сходстве, как в большинстве репортерных конструкций, а на общем свойстве ингибиторов трансляции останавливать перемещение рибосомы по мРНК, в данном случае мРНК *TrpL*, в котором два триптофана заменены на два аланина. В природном аттенуаторе триптофанового оперона, при недостатке триптофана в клетке, рибосома останавливается на 9 и 10 кодонах, кодирующих триптофан, из-за недостатка соответствующей aa-тРНК. Пауза в этом месте приводит к сворачиванию вторичной структуры благоприятной для транскрипции генов биосинтеза триптофана, которые закодированы после гена *trpL*. В нашей сигнальной системе *pDualrep2* для экспрессии гена *Katushka2S* необходимо, чтобы рибосома останавливалась или замедлялась так, чтобы это мешало образованию терминаторной шпильки.

Если в сублетальной концентрации, т.е. когда антибиотик уже действует на клетку, но полностью не подавляет рост, тестируемый образец будет вызывать торможение синтеза этого короткого пептида, то будет повышаться экспрессия сигнального гена флуоресцентного белка. Оказалось, что большинство антибиотиков, нарушающих трансляцию, индуцирует экспрессию репортерного гена. Особенно важно то, что

антибиотики, воздействующие на другие мишени, не вызывают индукции, значит подход не дает ложно-положительных сигналов и может быть использован для поиска новых ингибиторов синтеза белка.

Данный метод позволил обнаружить два новых ингибитора синтеза белка клебсазолицин и амикумацин А. Клебсазолицин – тиазол-оксазол-модифицированный пептид с амидиновым кольцом на N-конце. Кластер генов, отвечающий за его биосинтез, больше всего похож на кластер генов, кодирующих микроцин B17. Микроцин B17 природный ингибитор гиразы, его воздействие вызывает индукцию SOS-ответа, нам казалось логичным предположение о том, что и клебсазолицин действует сходным образом. Однако, репортерная система pDualrep2 показала, что в отличие от микроцина B17, который, как и ожидалось, вызывал индукцию экспрессии белка TurboRFP, находящегося под контролем промотора гена *sulA*, реагирующего на активацию системы SOS-ответа в клетке. Клебсазолицин ингибировал рост клеток, индуцируя экспрессию белка *Katushka2S*, которая должна происходить при снижении скорости трансляции, т.е. вызывал такую же реакцию, как и известный ингибитор синтеза белка эритромицин. Подавление синтеза белка клебсазолицином показано так же и в бесклеточной системе. При помощи рентгеноструктурного анализа было установлено, что этот антибиотик образует сеть взаимодействий с рРНК в районе пептидного туннеля, перекрывая путь для выхода пептида из рибосомы.

Амикумацин А – производное изокумарина, его антибактериальная активность была впервые обнаружена более тридцати лет назад, однако механизм действия не был установлен, несмотря на использование системного подхода, включающего изучение транскриптомного ответа на его действие. Разработанная в ходе данной работы репортерная система для обнаружения ингибиторов синтеза белка указывала на то, что в первую очередь амикумацин А нарушает синтез белка в клетке. Подтверждение этого получено при помощи экспериментов в бесклеточной системе синтеза белка. Структурные исследования позволили так же установить место связывания этого антибиотика – рядом с E-сайтом на малой субчастице рибосомы. Взаимодействуя одновременно и с мРНК, и 16S рРНК, амикумацин А «приклеивает» мРНК к рибосоме, препятствуя транслокации и дальнейшему продвижению рибосомы по мРНК.

Индукция экспрессии репортерного гена *Katushka2S* стрептограмминами класса А, в частности мадумицином II, привлекла наше внимание, так как имеющиеся ранее структурные данные указывали на то, что связывание таких антибиотиков должно мешать связыванию тРНК в Р-и А-сайтах. В таком случае индукция нашей системы, реагирующей

на замедляющие трансляцию антибиотики, происходить не должна. Нами показано, что мадумицин II препятствует продвижению рибосомы по мРНК после инициации, а также ингибирует первую пептидил-трансферазную реакцию, однако, в присутствии антибиотика обе тРНК в А- и в Р-сайте могут быть связаны, но с нарушением позиционирования их ССА-концов. Такое нарушение делает невозможной реакцию переноса пептида. Мадумицин II в дополнение к влиянию на расположение тРНК влияет и на конформацию некоторых нуклеотидов в ПТЦ. В комплексе с антибиотиком конформация ПТЦ идентична неактивному состоянию, описанному ранее в научной литературе. Перевод ПТЦ в неактивное состояние, по всей видимости, может быть причиной пролонгированной активности стрептограминов А класса после их удаления.

Разработанный подход может быть использован не только при поиске новых ингибиторов синтеза белка, но также для изучения и сравнения механизма действия уже известных ингибиторов. Мадумицин II, клебсазолицин и амикумацин А не похожи друг на друга ни по структуре, ни даже по сайтам связывания с рибосомой (рис. 18).

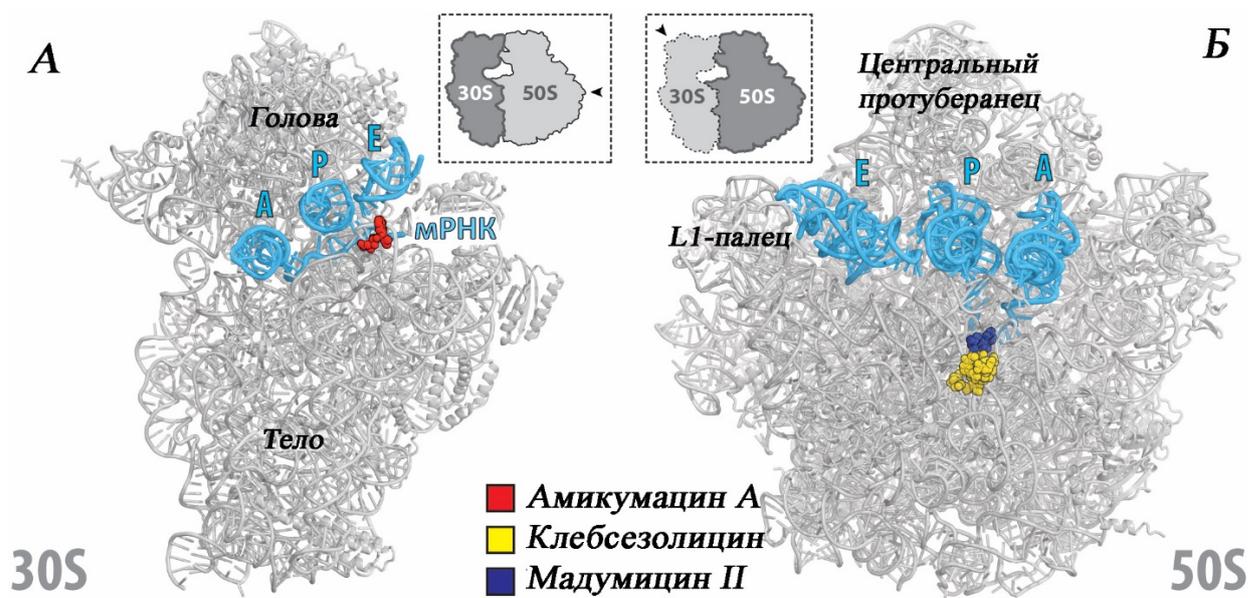


Рисунок 18. Сайты связывания антибиотиков амикумацина А (красный), клебсазолицина (желтый) и мадумицина II (синий) с 70S рибосомой.

Механизм действия при подавлении синтеза белка в бесклеточной системе у этих антибиотиков разный: амикумацин А препятствует транслокации, клебсазолицин затрудняет продвижение пептида по туннелю, а мадумицин II ингибирует пептидил-трансферазную реакцию. Однако, все эти три антибиотика при действии на клетки в сублетальной концентрации вызывают индукцию репортерной системы pDualrep2. После обнаружения при помощи репортерной системы pDualrep2 всех трех антибиотиков они изучались различными структурными, микробиологическими и биохимическими

методами. Детальное изучение механизма действия каждого из них помогло понять, почему они индуцировали экспрессию репортерного гена. Наиболее простой случай — это клебсазолицин, который связывается в рибосомном туннеле там же, где и макролиды, и стрептограмин Б. Данные антибиотики блокировали рост пептидной цепи, останавливая рибосому после прохождения нескольких кодонов.

Мадумицин II, стрептограмин А, как мы показали, не препятствует связыванию тРНК в А- и Р-сайтах, однако, уже образование первой пептидной связи заблокировано, поэтому рибосома оказывается остановленной на стартовом кодоне. Любопытно, что не все ингибиторы пептидил-трансферазной реакции, которые также должны вызывать остановку рибосомы на инициаторном кодоне, одинаково воздействуют на репортерную систему рDualrep2. Если для хлорамфеникола индукцию можно объяснить тем, что остановка трансляции происходит не на первом кодоне, а на одном из последующих, более предпочтительном для действия хлорамфеникола, то результат наблюдаемый для клиндамицина, объяснить не так легко. В экспериментах по тоепринтингу и клиндамицин, и мадумицин II останавливают рибосому на первом кодоне, однако, клиндамицин не индуцирует экспрессию репортерного гена, а мадумицин II индуцирует. Возможно, разница связана с тем, что при тоепринтинге антибиотики добавляются в большом избытке, а при анализе системой рDualrep2 антибиотик находится в сублетальной концентрации. Индукцию экспрессии *Katushka2S* сублетальной дозой мадумицина II можно объяснить или тем, что остановки рибосомы даже на первом кодоне достаточно, чтобы не образовывалась структура терминатора транскрипции. Несмотря на общее место связывания и даже одинаковый результат при тоепринтинге, мадумицин II и клиндамицин, судя по всему, на клетки действуют немного по-разному, и детали этого различия еще только предстоит определить.

Амикумацин А в отличие от мадумицина II и клебсазолицина взаимодействуют с малой субчастицей. Нам удалось показать, что этот антибиотик нарушает транслокацию. С помощью тоепринтинга показано, что амикумацин А снижает эффективность продвижения рибосомы по мРНК, из чего следует индукция экспрессии репортерного гена *Katushka2S*. Если индукция репортерной системы амикумацином А хорошо согласуется с наблюдаемыми структурными и биохимическими данными, то для некоторых других антибиотиков, взаимодействующих с малой субчастицей, все не так очевидно. Аминогликозиды и стрептомицин не индуцируют экспрессию нашей репортерной системы, в то время как эксперименты по тоепринтингу для аминогликозидов демонстрируют торможение трансляции на начальных кодонах. Возможно, при высокой концентрации в

тоепринтинге аминогликозиды в первую очередь ингибируют транслокацию, а при низкой вызывают гибель клеток за счет ошибок в синтезе белка, причем увеличение количества ошибок не будет приводить к торможению трансляции на лидерном пептиде и индуцировать экспрессию флуоресцентного белка. Гигромицин Б и спектиномицин похожи на аминогликозиды структурой и сайтом связывания, однако, эти антибиотики не влияют на точность трансляции, но подобно амикумацину А препятствуют транслокации, в результате в отличие от аминогликозидов они вызывают сильную индукцию репортерной системы. В одном сайте с амикумацином А связываются еще несколько антибиотиков – пактамицин, эдеин и касугамицин. Последние два ингибируют образование инициаторного комплекса, в то же время пактамицин оказывает сходное с амикумацином А влияние на трансляцию при тоепринтинге, но все-таки он не индуцирует экспрессию системы pDualrep2.

Все случаи отсутствия индукции репортерного белка ингибитором трансляции могут с одной стороны рассматриваться как пример неудачной работы системы, так как такой антибиотик был бы пропущен при поиске новых ингибиторов синтеза белка, с другой стороны репортерная система pDualrep2 становится еще одним инструментом для характеристики механизма действия ингибиторов трансляции, причем инструментом, работающим при сублетальной концентрации антибиотика, т.е. именно при той концентрации, при которой клетка начинает умирать или останавливается ее рост. Обнаруженные нами различия в индукции репортерного гена для антибиотиков, имеющих общий сайт связывания, и сходным образом влияющих на трансляцию в некоторых модельных экспериментах в бесклеточной системе трансляции, свидетельствуют, что механизм действия этих антибиотиков различается.

В заключение можно сказать, что в данной работе разработана и успешно использована эффективная, высокопроизводительная система поиска новых антибиотиков с одновременным определением механизма действия. Кроме практического использования, данная репортерная система может применяться для характеристики и изучения механизма действия ингибиторов трансляции. На основе разработанной системы поиска ингибиторов синтеза белка был разработан комплексный подход изучения ингибиторов синтеза белка, включающий в себя биохимические, структурные и микробиологические подходы. Сочетание этих подходов позволяет наиболее подробно описать механизм действия ингибитора синтеза белка и получить данные, которые могут быть использованы для его улучшения и превращения в средство борьбы с бактериями.

## Выводы

1. **Разработан подход к высокопроизводительному поиску ингибиторов синтеза белка.** Разработанный подход характеризуется высокой чувствительностью: позволяет детектировать ингибиторы трансляции в концентрации на порядок меньшей, чем минимальная ингибирующая, а также селективностью: позволяет детектировать ингибиторы трансляции различной структуры, взаимодействующие с разными участками рибосомы; при этом антибиотики, не действующие на синтез белка, не вызывают ложно положительных сигналов.
2. **Определён механизма действия мадумицина II, антибиотика класса стрептограминов А.** Мадумицин II ингибирует пептидил-трансферазную реакцию, препятствуя правильному позиционированию ССА-концов тРНК в А- и Р-сайтах. Связывание мадумицина II вызывает структурную перегруппировку пептидил-трансферазного центра, приводящую его в непродуктивное состояние.
3. **Найден новый ингибитор синтеза белка тиазол-оксазол-модифицированный пептид клебсазолицин.** Клебсазолицин связывается в пептидном туннеле рибосомы и препятствует выходу пептида из рибосомы при трансляции. Концевая амидиновая группа, составляющая основное отличие клебсазолицина от других тиазол-оксазол-модифицированных пептидов, играет ключевую роль при ингибировании трансляции.
4. **Найден новый ингибитор синтеза белка, содержащий изокумариновую группу, амикумацин А.** Амикумацин А взаимодействует одновременно с рРНК и мРНК, препятствуя транслокации. Амикумацин А подавляет трансляцию за счет стабилизации взаимодействия мРНК и рибосомы, в отличие от пактамицина, имеющего общий сайт связывания с амикумацином А и меняющего конформацию мРНК.
5. Структурно непохожие, связывающиеся в разных сайтах рибосомы антибиотики – мадумицин II, клебсазолицин и амикумацин А в сублетальных концентрациях не препятствуют инициации трансляции, но ингибируют продвижение рибосомы по мРНК.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus:

1. Jiang Z. K., Tuo L., Huang D. L., **Osterman I. A.**, Tyurin A. P., Liu S. W., Lukyanov D. A., Sergiev P. V., Dontsova O. A., Korshun V. A., Li F. N. and Sun C. H. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in beilun estuary national nature reserve of guangxi, China // *Frontiers in microbiology*. 2018. 9: 868
2. **Osterman I. A.**, Khabibullina N. F., Komarova E. S., Kasatsky P., Kartsev, V. G., Bogdanov A. A., Dontsova O. A., Konevega A. L., Sergiev P. V., and Polikanov Y. S. Madumycin ii inhibits peptide bond formation by forcing the peptidyl transferase center into an inactive state. // *Nucleic Acids Research*. 2017. V. 45, №12. P. 7507-7514
3. Metelev M., **Osterman I. A.**, Ghilarov D., Khabibullina N. F., Yakimov A., Shabalin K., Utkina I., Travin D. Y., Komarova E. S., Serebryakova M., Artamonova T., Khodorkovskii M., Konevega A. L., Sergiev P. V., Severinov K., and Polikanov Y. S. Klebsazolicin inhibits 70S ribosome by obstructing the peptide exit tunnel // *Nature Chemical Biology*. 2017. V.13, №10. P.1129-1136.
4. Nazarov P.A., **Osterman I.A.**, Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N.. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics . // *Scientific Reports*. 2017 V. 7 №1. P.1394
5. **Osterman, I.A.**, Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A., and Sergiev, P.V. Techniques for screening translation inhibitors // *Antibiotics*. 2016. V. 5, № 3. P. 22.
6. **Osterman I.A.**, Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: A double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016. V. 60, №12. P. 7481-7489.
7. Beloglazkina E.K., Manzheliy E.A., Moiseeva A.A., Maloshitskaya, O.A., Zyk, N.V., Skvortsov, D.A., **Osterman, I.A.**, Sergiev, P.V., Dontsova, O.A., Ivanenkov, Y.A., Veselov, M.S., Majouga, A.G. Synthesis, characterisation, cytotoxicity and antibacterial activity of ruthenium(II) and rhodium(III) complexes with sulfur-containing terpyridines // *Polyhedron*. 2016. V. 107. P. 27-37.
8. Сергиев П.В., **Остерман И.А.**, Головина А.Я., Лаптев И.Г., Плетнев Ф.И., Евфратов С.А., Марусич Е.И., Леонов С.В., Иваненков Я.А., Богданов А.А., Донцова О.А. Применение репортерных штаммов для скрининга новых антибиотиков. *Биомедицинская химия*. 2016. Т. 62. № 2. С. 117-123.
9. **Osterman I.A.**, Evfratov S.A., Dzama M.M., Pletnev P.I., Kovalchuk S.I., Butenko I.O., Pobeguts O.V., Golovina A.Y., Govorun V.M., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. A bacterial homolog YciH of eukaryotic translation initiation factor eIF1 regulates stress-related gene expression and is unlikely to be involved in translation initiation fidelity // *RNA Biology*. 2015 V. 12, № 9. P. 966-971.
10. **Остерман И.А.**, Дихтяр Ю.Ю., Богданов А.А., Донцова О.А., Сергиев П.В. Регуляция экспрессии генов бактериальной флагеллы // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 11. С. 1662-1672.

11. Сергиев П.В., Остерман И.А., Головина А.Я., Андреева Е.С., Лаптев И.Г., Плетнев Ф.И., Евфратов С.А., Марусич Е.И., Веселов М.С., Леонов С.В., Иваненков Я.А., Богданов А.А., Донцова О.А. Высокопроизводительная платформа для скрининга новых ингибиторов биосинтеза белка // *Вестник Московского университета Серия 2: Химия*. 2015. Т. 56. № 6. С. 405-408.
12. Веселов М.С., Сергиев П.В., Остерман И.А., Скворцов Д.А., Головина А.Я., Андреева Е.С., Лаптев И.Г., Плетнев Ф.И., Евфратов С.А., Марусич Е.И., Леонов С.В., Иваненков Я.А., Богданов А.А., Донцова О.А. Общие черты антибактериальных соединений: анализ выборки 10000 веществ // *Биомедицинская химия*. 2015. Т. 61. № 6. С. 785-790.
13. Polikanov Y.S., **Osterman I.A.**, Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochek P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Konevega A.L., Shaw K.J., Bogdanov A.A., Rodnina M.V., Dontsova O.A., Mankin A.S., Steitz T.A., Sergiev P.V. Amicoumacin A Inhibits Translation by Stabilizing mRNA Interaction with the Ribosome // *Molecular Cell*. 2014. V. 56, №4. P. 531-540.
14. Zukher, I., Novikova, M., Tikhonov, A., Nesterchuk, M.V., **Osterman, I.A.**, Djordjevic, M., Sergiev, P.V., Sharma, C.M., Severinov, K. Ribosome-controlled transcription termination is essential for the production of antibiotic microcin C // *Nucleic Acids Research*. 2014. V. 42, №19. P. 11891-11902.
15. **Osterman I.A.**, Evfratov S.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation // *Nucleic Acids Research*. 2013. V. 41, № 1. P. 474-486.
16. **Osterman I.A.**, Ustinov A.V., Evdokimov D.V., Korshun V.A., Sergiev P.V., Serebryakova M.V., Demina I.A., Galyamina M.A., Govorun V.M., Dontsova O.A. A nascent proteome study combining click chemistry with 2DE // *Proteomics*. 2013. V. 13, № 1. P. 17-21.
17. Prokhorova I.V., **Osterman I.A.**, Burakovsky D.E., Serebryakova M.V., Galyamina M.A., Pobeguts O.V., Altukhov I., Kovalchuk S., Alexeev D.G., Govorun V.M., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Modified nucleotides m(2)G966/m(5)C967 of Escherichia coli 16S rRNA are required for attenuation of tryptophan operon // *Scientific Reports*. 2013. V. 18, № 3. P. 3236.

Патенты:

1. Ефременкова О. В., Маланичева И. А., Зенкова В. А., Малютин Н. М., Васильева Б. Ф., Сумарукова И. Г., Резникова М. И., Байшев И. Т., Ефименко Т. А., Рогожин Е. А., Салимова Е. И., Королев А. М., **Остерман И. А.**, Сергиев П. В. / Штамм *Bacillus subtilis* и способ получения антибиотика амикумацина А с его применением. Патент на изобретение №: 0002627187 от 3 августа 2017 года.
2. **Остерман И. А.**, Андреева Е. С., Сергиев П. В., Евфратов С. А., Донцова О. А., Иваненков Я. А., Лаптев И. Г., Плетнев Ф. И., Марусич Е. И., Леонов С. В., Головина А. Я. / Рекомбинантная плазмидная ДНК рDualger2 и штамм, трансформированный ею для выявления веществ и смесей, ингибирующих биосинтез белка и/или вызывающих SO-ответ у бактерий. Патент на изобретение №: 0002620074 от 22 мая 2017 года.

Избранные тезисы докладов на научных конференциях:

1. **Osterman I.A.**, Komarova E.S., Lukyanov D.A., Khven I.M., Shiriaev D.I., Maviza T.P., Veselov M.S., Ayginin A.A., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. (2018) Mechanism-based antibiotic discovery platform. The 43th Federation of European Biochemical Societies Congress, Prague, Czech Republic, FEBS Open Bio. ShT. 08 -1
2. **Osterman I.A.**, Komarova E.S., Skvortsov D.A., Khven I.M., Shiryayev D.I., Lukyanov D., Marusich E.I., Veselov M.S., Leonov S.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. (2016) Double high-throughput reporter for translation and replication inhibitors. V Congress of the Russian Biochemical Society / V съезд биохимиков России, Sochi, Russia, ActaNaturae, Спецвыпуск, Т.6, С. 21.
3. **Остерман И.А.**, Хабибуллина Н.Ф., Комарова Е.С., Касацкий П., Карцев В.Г., Богданов А., Донцова О.А., Коневега А.Л., Сергиев П.В., Поликанов Ю.С. Мадумицин II ингибирует образование пептидной связи, приводя пептидилтрансферазный центр в неактивное состояние. (2017). 12th International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, ActaNaturae, спецвыпуск, Т. 2, С. 95.
4. Khabibullina N., Komarova E., Sergiev P., Severinov K., Polikanov Y., **Osterman I.**, Metelev M. (2017) Klebsazolicin - new translational inhibitor, that blocks the elongation of the nascent peptide. EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control, Heidelberg, Germany, Abstract book. P. 244
5. 2016 High-throughput screening of 50 thousands compounds for antimicrobial activity with simultaneous classification by the mechanisms of action (Стендовый) Авторы: **Osterman I.A.**, Komarova E.S., Skvortsov D.A., Khven I.M., Shiryayev D.I., Lukyanov D., Marusich E.I., Veselov M.S., Leonov S.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. EMBO Conference: Chemical Biology 2016, Heidelberg, Germany, Abstract book. P. 187.