

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

Шуленина Ольга Владиславовна

**Система для поиска и анализа соединений
с антибактериальной активностью**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Коневега Андрей Леонидович

Санкт Петербург, 2020

Научно-квалификационная работа выполнена в ВШ/на кафедре Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор ВШ/Зав.каф. :

Журихина Валентина Владимировна,
доктор физико-математических наук,
Высшая инженерно-физическая школа,
доцент

Научный руководитель:

Коневега Андрей Леонидович,
кандидат физико-математических наук,
Высшая школа биомедицинских систем
и технологий, доцент

Рецензент:

Усачев Константин Сергеевич,
кандидат физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник,
Казанский (Приволжский) федеральный
университет, доцент

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Широкое использование антибиотиков привело к повсеместному распространению антибиотикорезистентных бактериальных штаммов. Следствием этого является уменьшение количества эффективных антибактериальных препаратов, применяемых в терапевтических целях. Наиболее популярными подходами, используемыми для решения данной проблемы, являются: исследование антибиотиков, механизм действия которых изучен недостаточно; внесение химических модификаций в молекулы известных антибиотиков; поиск природных соединений, проявляющих антибактериальные свойства.

Сочетание различных стратегий поиска и исследования природных и синтетических антибактериальных соединений представляет собой адекватный системный подход к преодолению проблемы распространения устойчивости бактерий к антибиотикам. Использование такого системного подхода значительно повышает вероятность обнаружения новых антимикробных веществ и достижения более глубокого понимания молекулярных механизмов действия антибиотиков.

Цели исследования

Цели исследования – определить и уточнить молекулярный механизм действия антибиотика природного происхождения мадумидина II и искусственно синтезированного соединения «984» с противомикробными свойствами, а также произвести поиск природных веществ с антибактериальной активностью.

Задачи исследования

1. Организовать музей коллекции дрожжевых организмов ОМРБ ПИЯФ.
2. Разработать методику, позволяющую анализировать антибактериальную активность исследуемых образцов в жидкой среде с применением репортерного бактериального штамма.
3. Применить разработанную методику, позволяющую анализировать антибактериальную активность с использованием репортерного бактериального штамма, для изучения продуктов метаболизма дрожжевых организмов коллекции ОМРБ ПИЯФ.
4. Произвести таксономическую идентификацию дрожжевых организмов коллекции, продукты метаболизма которых продемонстрировали антимикробную активность.
5. Определить наличие антибактериальной активности вещества «984» с помощью разработанной методики, позволяющей анализировать антимикробную активность с использованием репортерного бактериального штамма.
6. Установить влияние вещества «984» на активность ДНК-полимераз Pfu и PfuS в условиях *in vitro* при проведении полимеразной цепной реакции.
7. Установить влияние вещества «984» на активность РНК-полимеразы T7 в условиях *in vitro* при проведении реакции транскрипции.
8. Установить с помощью биохимических методов анализа влияние последовательности связывания мадумидина II и компонентов для формирования инициаторного комплекса на образование первой пептидной связи.

9. Определить с использованием метода флуориметрии константу скорости реакции связывания мадумицина II с рибосомными комплексами.
10. Определить с использованием биохимических методов анализа и метода флуориметрии влияние мадумицина II на образование первой пептидной связи.
11. Определить с использованием биохимических методов анализа и метода флуориметрии влияние мадумицина II на образование второй пептидной связи.

Научная новизна

В настоящей работе с помощью разработанной нами методики анализа антибактериальной активности мы впервые установили способность ряда продуктов метаболизма дрожжевых штаммов коллекции подавлять клеточный рост репортерного бактериального штамма.

Мы впервые показали способность неизученного ранее соединения «984» ингибировать бактериальный рост и приводить к изменениям в клетке, которые свидетельствуют об активации SOS ответа и нарушениях процесса биосинтеза белка.

Мы впервые установили скорость реакции связывания мадумицина II с инициаторными рибосомными комплексами. Методом флуориметрии, впервые примененным к изучению рибосомных комплексов с мадумицином II, мы установили, что антибиотик вызывает значительные конформационные изменения в рибосомных комплексах с инициаторной тРНК в Р сайте и менее выраженные конформационные изменения в рибосомных комплексах с дипептидил-тРНК в Р сайте. Нами было обнаружено, что степень конформационных изменений соответствует выраженности ингибирующего эффекта мадумицина II в отношении образования пептидной связи.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в данной работе результаты позволяют расширить представление об антибактериальных свойствах метаболитов дрожжевых микроорганизмов, обитающих на Камчатке, Курильских островах и Сахалине. Наша работа по созданию музея коллекции дрожжевых штаммов позволяет сохранить данные организмы для будущих исследований.

Установленная в данной работе антибактериальная активность вещества «984» демонстрирует его терапевтический потенциал. Наличие противомикробных свойств у соединения «984» позволяет использовать его в качестве основы для направленного синтеза новых молекул и оптимизации уже существующих веществ.

Результаты исследования молекулярного механизма действия мадумицина II позволяют лучше понять процессы, которые происходят при взаимодействии данного антибиотика с бактериальной рибосомой. Эта информация может быть использована в целях развития фундаментальной науки для подробного изучения парциальных реакций трансляции и при сравнении свойств различных антибиотиков. Мадумицин II является потенциальным лекарственным препаратом, что придает полученным результатам практическую значимость.

Апробация работы и публикации

Результаты данной работы были представлены на международных и российских конференциях. По материалам исследования были опубликованы 10 печатных работ, среди них в рецензируемых научных журналах – 2, в сборниках тезисов – 8.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Применение репортерного бактериального штамма *E. coli* JW5503, несущего плазмиду pDualrep2, для анализа антибактериальной активности продуктов метаболизма дрожжевых организмов коллекции ОМРБ ПИЯФ позволило выявить образцы с антимикробными свойствами.
2. Вещество «984» проявляет антибактериальную активность и приводит к нарушениям, связанным с активацией SOS ответа и ингибированием биосинтеза белка.
3. Связывание мадумицина II с рибосомными комплексами, содержащими инициаторную тРНК или дипептидил-тРНК в Р сайте, приводит к конформационным изменениям, которые влекут за собой нарушение образования пептидной связи, при этом степень конформационных изменений соответствует выраженности ингибирующего эффекта мадумицина II в отношении образования пептидной связи.

1. Обзор литературы

Эффективность применяемых антибиотиков снижается в результате формирования к ним бактериальной устойчивости и ее дальнейшего распространения. В связи с этим одной из важных исследовательских задач на сегодняшний день является поиск и изучение соединений с антимикробными свойствами [1,2].

Одним из источников антибактериальных соединений являются природные вещества, образующиеся в результате жизнедеятельности различных организмов. Многие природные антибиотики были получены из клеток бактерий и грибов. Преимущество природных соединений по сравнению с искусственно синтезированными состоит в том, что эффективность таких веществ проходит проверку в ходе длительного естественного отбора, а не в лабораторных условиях [3].

В настоящее время ведется множество исследований, нацеленных на обнаружение организмов, проявляющих антимикробные свойства. При этом объектами изучения являются аэробные почвенные бактерии актиномицеты [4,5], эндофитные грибы и растения [6], морские грибы [7], а также дрожжи [8–10]. Дрожжи обладают многими уникальными биологическими и химическими характеристиками. Они повсеместно сосуществуют с бактериями, что вынуждает их развивать клеточные механизмы для успешной конкурентной борьбы. Среди таких механизмов – способность дрожжей ингибировать бактериальный рост с помощью продуктов метаболизма, которые обладают противомикробной активностью [11–13].

Интересным объектом для изучения является уникальная коллекция дрожжей и дрожжеподобных грибов коллекции ОМРБ ПИЯФ. Данная коллекция была сформирована в результате четырех научно-исследовательских экспедиций в труднодоступные и экстремальные

зоны полуострова Камчатка, Курильских островов и острова Сахалин и насчитывает порядка 2500 штаммов [14].

Другим важным источником новых антибактериальных соединений является химический синтез. Введение химических модификаций в известные молекулы природных антибиотиков и комбинирование различных молекулярных структур позволяют получать новые антибактериальные соединения с улучшенными свойствами [15].

Одним из интересных примеров является вещество «984» (рис. 1), имеющее структурное сходство с производными 5-нитрофуранов, проявляющими антибактериальную активность, и активным компонентом противовирусного препарата Триазавирин®.

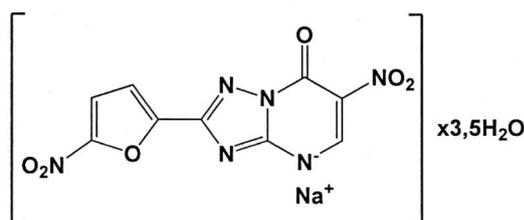


Рисунок 1 – Химическая структура вещества «984».

Производные 5-нитрофуранов обладают широким спектром антимикробного действия, и при этом бактериальная устойчивость к ним развивается медленно [16]. 5-нитрофураны являются пролекарствами, и их преобразование в биоактивные формы происходит в бактериальной клетке в результате метаболических процессов азоредукции гидразона и нитроредукции 5-нитрофуранового кольца. В результате таких модификаций образуются метаболиты, которые приводят к изменениям конформации белков, нарушают биосинтез нуклеиновых кислот, а также активируют окислительный стресс [17].

Активный компонент препарата Триазавирин® представляет собой соединение азолазиновой группы с широким спектром противовирусной активности [18]. Данное соединение способно образовывать супрамолекулярные комплексы в растворе, которые формируются посредством взаимодействия азолазиновых групп. Такие супрамолекулярные комплексы способны к мультицентровому связыванию с боковыми цепями основных аминокислотных остатков, экспонированными на поверхности белка. С помощью метода молекулярной динамики и метода динамического светорассеяния было показано, что отдельные молекулы активного компонента Триазавирин® на начальном этапе связывания с модельным полипептидом взаимодействуют с основными аминокислотными остатками, а на последующих этапах – с положительно заряженными боковыми цепями аминокислотных остатков и с присоединившимися ранее молекулами [19,20].

Изучение соединений, активность которых была доказана, но мало изучена, также вносит вклад в решение проблемы создания новых антибактериальных препаратов. Большая часть применяемых в настоящее время антибиотиков является ингибиторами биосинтеза белка, и в качестве их мишени выступает рибосома. Рибосомная РНК составляет большую часть клеточной РНК и является платформой для связывания малых молекул [21].

Ингибиторы трансляции, мишенью которых является рибосома, взаимодействуют с относительно небольшим количеством сайтов связывания. На малой 30S субъединице рибосомы антибиотики преимущественно связываются с сайтами, расположенными вблизи молекул мРНК и тРНК, предотвращая стабильное взаимодействие инициаторной тРНК со стартовым кодоном в Р сайте, препятствуя доставке аминоксил-тРНК в А сайт или блокируя передвижение комплекса мРНК-тРНК. На большой 50S субъединице антибиотики преимущественно связываются с сайтами, расположенными в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) или вблизи него, предотвращая образование пептидной связи или нарушая прохождение пептида по выходному тоннелю [22].

Антибиотик мадумицин II является ингибитором трансляции, и механизм его действия изучен мало. Данное соединение относится к классу антибиотиков стрептограмин А (рис. 2). Интерес к мадумицину II обусловлен тем, что он связывается в ПТЦ бактериальной рибосомы и оказывает сильный ингибирующий эффект на образование первой пептидной связи [23]. В *in vitro* системе трансляции при концентрации мадумицина II 5 мкМ происходило 5-кратное снижение количества дипептида. Аналогичного влияния мадумицина II на образование второй пептидной связи обнаружено не было.

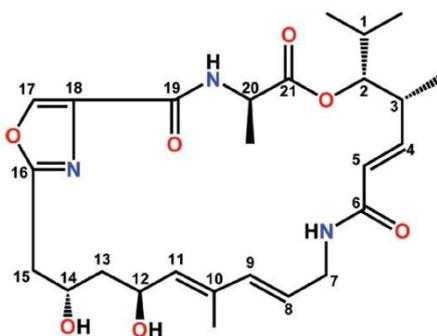


Рисунок 2 – Химическая структура мадумицина II.

В процессе поиска новых антимикробных веществ часто возникает необходимость анализировать соединения с неизвестной структурой и неустановленным механизмом действия. Для решения данной задачи целесообразно применять модифицированные бактериальные штаммы, клетки которых способны синтезировать флуоресцентные репортерные белки стресса в случае, если в среде имеется вещество, ингибирующее определенный клеточный механизм. Количество репортерных белков стресса может быть определено по уровню их собственной флуоресценции [24,25]. Такой подход позволяет обнаруживать соединения, способные проникать в клетку и проявлять свои цитотоксические свойства. К настоящему времени сконструировано множество репортерных штаммов, способствующих выявлению антибактериальных веществ, влияющих, к примеру, на метаболизм ДНК и биосинтез белка [26,27].

Удобным исследовательским инструментом является бактериальный штамм *E. coli* JW5503, трансформированный репортерной плазмидой pDualrep2 (рис. 3) [28]. Плазмида pDualrep2 несет ген, кодирующий флуоресцентный белок RFP (553/574 нм), под контролем SOS-

индуцибельного промотора *sulA* и ген, кодирующий флуоресцентный белок Katushka2S (588/633 нм) под контролем модифицированного триптофанового аттенуатора, управляемого промотором T5. В присутствии веществ, вызывающих нарушения биосинтеза ДНК (активирующих клеточный SOS ответ), клетки репортерного штамма синтезируют белок RFP, а в присутствии ингибиторов трансляции – белок Katushka2S. Данная система успешно применялась для скрининга природных экстрактов и химически синтезированных соединений [28].

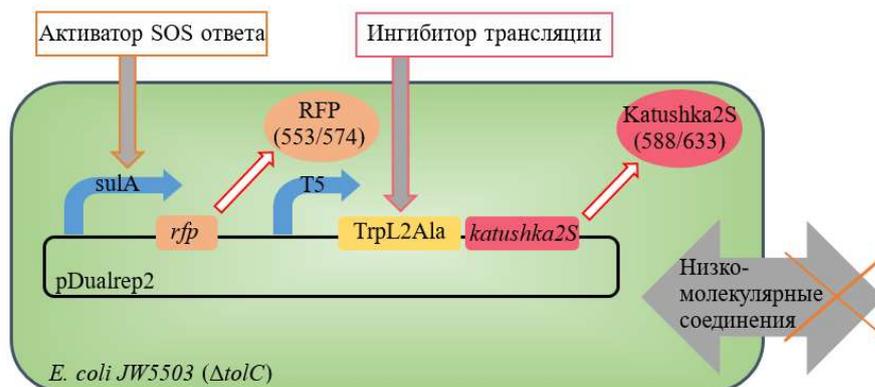


Рисунок 3 – Строение репортерной бактериальной системы.

В случае, когда возможный механизм действия исследуемого соединения установлен, требуется проведение детального анализа вещества в условиях *in vitro* с использованием отдельных клеточных мишеней. Например, для определения молекулярного механизма действия ингибиторов трансляции изучают эффекты, оказываемые ингибитором на те или иные парциальные реакции процесса биосинтеза белка. Рассмотрим основные этапы трансляции.

Синтез белка происходит на рибосомах, которые осуществляют перевод нуклеотидной последовательности мРНК в аминокислотную последовательность белка, используя аминокислоты, транспортируемые молекулами тРНК. Бактериальная рибосома представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс 70S, состоящий из двух субъединиц – малой 30S и большой 50S. Большая субъединица катализирует образование пептидных связей в ПТЦ, а малая субъединица обеспечивает корректный перевод нуклеотидной последовательности мРНК в аминокислотную в центре декодирования [29].

На 70S рибосоме расположены три сайта, через которые в процессе биосинтеза белка последовательно проходят молекулы тРНК. Поступающая на рибосому аминоацелированная тРНК связывается в А сайт. Пептидильная тРНК, несущая пептид, перемещается из А сайта в Р сайт. После деацелирования тРНК переходит в Е сайт, из которого в дальнейшем покидает рибосому. Трансляция представляет собой динамичный процесс, который включает в себя этапы инициации, элонгации, терминации и рециркуляции. Каждый этап катализируется белковыми факторами трансляции. Важную роль в процессе биосинтеза белка играют конформационные флуктуации рибосомы [30].

Инициация – первый этап трансляции. Результатом инициации становится инициаторный комплекс – ассоциированная 70S рибосома, содержащая инициаторную fMet-тРНК^{fMet} в Р сайте,

где позиционируется стартовый кодон мРНК (в большинстве случаев таким кодоном является AUG). Данный этап катализируется белковыми факторами инициации IF1, IF2, IF3. Фактор IF2 при этом является ГТФ-зависимым [31].

Элонгация представляет собой цикл, в котором последовательно происходят процессы декодирования, образования пептидной связи и транслокации. Данный этап начинается после того, как образовался инициаторный комплекс и заканчивается, когда рибосома достигает стоп-кодона. В начале элонгации пептидил-тРНК находится в Р сайте, а в А сайте располагается кодон, который распознается аминоацил-тРНК, доставляющей аминокислоту к рибосоме в составе тройного комплекса с EF-Tu и ГТФ. В ходе пептидилтрансферазной реакции между аминокислотой А-сайтовой тРНК и пептидом Р-сайтовой тРНК возникает пептидная связь, и пептидная цепь остается связанной с А-сайтовой тРНК. Далее происходит процесс транслокации – продвижение молекул тРНК из А и Р сайтов в Р и Е сайты, соответственно. В Р сайте оказывается пептидил-тРНК, в Е сайте – деацилированная тРНК. Рибосома готова к следующему циклу. Элонгация катализируется ГТФ-зависимыми белковыми факторами трансляции EF-Tu и EF-G [32].

Терминация – финальный этап трансляции. Трансляция завершается, когда стоп-кодон оказывается в А сайте. В ходе этого процесса полипептид отсоединяется от пептидил-тРНК в Р сайте и высвобождается из рибосомы через туннель выхода пептида на 50S субъединице. Терминация катализируется белковыми факторами терминации RF1, RF2, RF3. Фактор RF3 при этом является ГТФ-зависимым [33].

2. Материалы и методы

Буферы и реагенты. Дрожжевые штаммы, используемые в данной работе, были взяты из коллекции дрожжей и дрожжеподобных грибов ОМРБ ПИЯФ.

Репортерный бактериальный штамм *E. coli* JW5503, трансформированный репортерной плазмидой pDualrep2, любезно предоставлен Остерманом И. А. (МГУ имени М. В. Ломоносова).

Вещество «984» было предоставлено ФГАОУВО «УрФУ имени Первого Президента России Б. Н. Ельцина». Брутто-формула вещества «984»: $C_9H_3N_6NaO_6 \times 3,5H_2O$. Химическая структура вещества «984» представлена на рис. 1. Данное соединение имеет в своей структуре 5-нитрофурановую и азолазиновую группы. Растворителем для вещества «984» являлся 5% ДМСО.

Антибиотик мадумицин II любезно предоставлен Остерманом И. А. (МГУ имени М. В. Ломоносова). Химическая структура мадумицина II представлена на рис. 2. Мадумицин II является представителем группы антибиотиков стрептограмин А. Растворителем для мадумицина II являлся 100% ДМСО.

Все эксперименты по анализу молекулярного механизма действия мадумицина II выполнены в буфере А (50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 70 мМ NH₄Cl, 30 мМ KCl, 7 мМ MgCl₂) при температуре 37 °С. Химические реагенты, используемые в данной работе, были от фирм Sigma Aldrich, Merck, AppliChem Panreac. Также в работе использовали радиоактивно меченый валин [¹⁴C]Val (Amersham) и флуоресцентную метку Bodipy FL (BPy) (Invitrogen).

Рибосомы, тРНК, мРНК, белковые факторы. В работе использовали 70S рибосомы из *E. coli* MRE600, fMet-тРНК^{fMet}, элонгационные факторы EF-Tu и EF-G, инициаторные факторы IF1, IF2, IF3, Phe-тРНК^{Phe}, [¹⁴C]Val-тРНК^{Val}, ВРУ-Met-тРНК^{fMet}. Данные препараты получены в Лаборатории биосинтеза белка, НИЦ «КИ» - ПИЯФ, Гатчина, согласно описанным методикам [34–38].

В работе использовали матричную РНК (MVF-мРНК) длиной 92 нуклеотида. Участок ДНК, последовательность которого соответствовала последовательности MVF-мРНК, содержится в модифицированной плазмиде pUC18. Для амплификации данного участка ДНК провели полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с ДНК-полимеразой Pfu и праймерами TW и LP. MVF-мРНК была получена путем *in vitro* транскрипции с РНК-полимеразой T7 на основе амплифицированного фрагмента ДНК. Очистка MVF-мРНК производилась методом ионообменной хроматографии с помощью хроматографической системы низкого давления Akta Start (GE Healthcare) на колонке HiTrapQ 5 мл (GE) в линейном градиенте 0,1 – 1,5М хлорида натрия.

Нуклеотидная последовательность MVF-мРНК: 5'...AUG·GUU·UUU·AUU·ACU·ACG...-3', кодирующая, соответственно, аминокислотную последовательность **Met-Val-Phe-Ile-Thr-Thr...** Последовательность праймера TW: 5'-CGAATTТААТАСГАСТСАСТАТАГГ-3'. Последовательность праймера LP: 5'-GCTTGCATGCCTGCAGACGCA-3'.

Рибосомные комплексы. Инициаторные рибосомные комплексы получали в результате инкубации рибосом с 3-кратным избытком мРНК, 1,5-кратным избытком инициаторных факторов IF1, IF2, IF3 и 2-кратным избытком fMet-тРНК^{fMet} или 1,5-кратным избытком ВРУ-Met-тРНК^{fMet} в буфере А, содержащем 1 мМ ГТФ и 2 мМ ДТТ в течение 1 часа при 37 °С. Инициаторные комплексы, содержащие ВРУ-Met-тРНК^{fMet}, подвергали очистке методом эксклюзионной хроматографии с помощью хроматографической системы высокого давления Alliance E2695 (Waters) на колонке Biosuite 250 5 мкм HR 7.8×300 (Waters).

Тройные комплексы [[¹⁴C]Val-тРНК^{Val} • EF-Tu • ГТФ] и [Phe-тРНК^{Phe} • EF-Tu • ГТФ] получали в результате инкубации EF-Tu с 1 мМ ГТФ, 3 мМ фосфоенолпируватом, 2 мМ ДТТ и 1% пируваткиназой в буфере А в течение 15 мин при 37 °С и дальнейшей инкубацией с 1,5-кратным недостатком [¹⁴C]Val-тРНК^{Val} или Phe-тРНК^{Phe} в буфере А в течение 1 мин при 37 °С.

Претранслокационные комплексы, содержащие ВРУ-Met-[¹⁴C]Val-тРНК^{Val} в А сайте, получали в результате инкубации инициаторных комплексов с флуоресцентно меченой ВРУ-Met-тРНК^{fMet} с 2-кратным избытком тройного комплекса [[¹⁴C]Val-тРНК^{Val} • EF-Tu • ГТФ] в буфере А в течение 5 мин при 37 °С.

Посттранслокационные комплексы, содержащие ВРУ-Met-[¹⁴C]Val-тРНК^{Val} в Р сайте, получали в результате инкубации претранслокационных комплексов с 1 мкМ EF-G и 1 мМ ГТФ в буфере А в течение 2 мин при 37 °С.

Культуральные жидкости дрожжей. Продукты метаболизма дрожжевых организмов получали в виде культуральных жидкостей. Для этого дрожжевые клетки выращивали в жидкой среде YPD (Sigma-Aldrich) в течение 72 часов при температуре 25 °С и отделяли от культуральной жидкости центрифугированием на центрифуге Union 5KR centrifuge

(Hanil Science Industrial). Полученные культуральные жидкости концентрировали в 10-20 раз на вакуумном центрифужном концентраторе Concentrator Plus (Eppendorf AG) при температуре 30 °С и использовали для дальнейшего анализа.

Анализ антибактериальной активности. Для анализа антибактериальной активности культуральных жидкостей дрожжей и вещества «984» использовали разработанную нами методику. Клетки репортерного бактериального штамма выращивали в жидкой среде LB (VWR Life Science AMRESCO), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при температуре 37 °С до тех пор, пока оптическая плотность OD₆₀₀ не достигала 0,5-1 оптических единиц. Оптическую плотность клеточной культуры определяли с помощью спектрофотометра Ultrospec 10 (Amersham Biosciences). Для анализа полученную клеточную культуру разбавляли до OD₆₀₀ = 0,1 и помещали в лунки 96-луночного культурального планшета. Тестируемые образцы добавляли к клеткам репортерного штамма в лунки планшета. В качестве положительного контроля использовали антибиотики с установленным механизмом действия, а именно, налидиксовую кислоту, индуцирующую SOS ответ, и тетрациклин, ингибирующий трансляцию. Планшет с культурой клеток и тестируемыми образцами инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Измерения OD₆₀₀ бактериальной культуры и флуоресцентных сигналов репортерных белков RFP (553/574 нм) и Katushka2S (588/633 нм) проводили с помощью планшетного анализатора Enspire2300 (Perkin Elmer). Измерения проводили каждый час в течение первых 5 часов инкубации во время фазы активного клеточного роста и спустя 24 часа. Графические зависимости флуоресцентных репортерных сигналов и OD₆₀₀ от времени строили с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

Таксономическая идентификация дрожжевых организмов. Таксономическую идентификацию штаммов дрожжей, культуральные жидкости которых проявили антибактериальные свойства, проводили с помощью секвенирования последовательности внутреннего транскрибируемого региона ITS1-5.8S-ITS2 и доменов D1/D2 гена большой рибосомной субъединицы (26S рДНК) [39]. Выделение геномной ДНК осуществляли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), в качестве лизирующего фермента использовали зимолиазу (Zymo Research). Амплификацию видоспецифичных участков ДНК проводили с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher Scientific) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Для амплификации и секвенирования по Сэнгеру (в компании Евrogen <http://evrogen.ru/>) использовали стандартные праймеры ITS1, ITS4, LROR, LR3, LR3R, LR7 [39]. Анализ нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов осуществляли с помощью базы данных BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

In vitro полимеразные реакции. Влияние вещества «984» в диапазоне концентраций от 9,4 мкг/мл до 300 мкг/мл на активность полимераз проверяли с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимераз Pfu (Promega) и PfuS (получена в Лаборатории биосинтеза белка, НИЦ «КИ» - ПИЯФ; помимо аминокислотной последовательности Pfu содержит ДНК-удерживающий белок Sac7D) и с помощью реакции *in vitro* транскрипции с использованием РНК-полимеразы T7 (получена в Лаборатории биосинтеза белка, НИЦ «КИ» - ПИЯФ). ПЦР производили с помощью амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). *In vitro* транскрипцию проводили в жидкостном

термостате в течение 3 часов при температуре 37 °С. Продукты реакций визуализировали после электрофоретического разделения при 5 В/см в 1,5% агарозном геле и анализировали с помощью гель-документирующей системы Quantum CX5 (Vilber).

Образование ди- и трипептидов. Инициаторные или посттранслокационные рибосомные комплексы инкубировали с мадумицином II (концентрации антибиотика составляли 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3,2 мкМ, 5 мкМ), затем добавляли тройные комплексы [^{14}C]Val-тРНК^{Val} • EF-Tu • ГТФ] или [Phe-тРНК^{Phe} • EF-Tu • ГТФ] и продолжали инкубацию. Спустя 5 мин или 30 мин останавливали реакцию, производили гидролиз щелочью. Для этого добавляли КОН в объеме, равном 0,1 объема исследуемой смеси. Затем производили нейтрализацию кислотой. Для этого добавляли СН₃СООН в объеме, равном объему щелочи. С помощью обратнофазной хроматографии на колонке LiChrospher® 100 RP-8 (5 μm) LiChroCART® 250-4 (Merck) проводили разделение ди- и трипептидов от свободной радиоактивно меченой аминокислоты в линейном градиенте 0 – 65% ацетонитрила. Объем полученных фракций составлял 1 мл. Количество радиоактивно меченого валина в полученных фракциях определяли с помощью сцинтилляционного радиометра TRI-CARB 5110 TR (PerkinElmer), для этого к полученным фракциям добавляли сцинтиллятор на основе оксазолил бензола и дифенилоксазола. Эффективность образования пептидной связи определяли по количеству радиоактивно меченой аминокислоты, включенной в образовавшийся пептид.

Связывание тРНК в А сайт. Для определения количества [^{14}C]Val-тРНК^{Val}, связавшейся с А сайтом, рибосомные комплексы инкубировали с мадумицином II (концентрации антибиотика составляли 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3,2 мкМ, 5 мкМ), затем добавляли тройные комплексы и продолжали инкубацию. Спустя 5 мин или 30 мин останавливали реакцию и наносили полученные смеси на нитроцеллюлозные фильтры (Sartorius). Фильтры промывали буфером А. Для определения общего количества радиоактивно меченой аминокислоты, ассоциированной с тРНК в образце, рибосомные комплексы после их инкубации с мадумицином II и тройными комплексами осаждали в присутствии 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в течение 20 мин при 0 °С. Полученную смесь наносили на нитроцеллюлозные фильтры. Фильтры промывали 6% ТХУ.

Количество радиоактивно меченого валина, связавшегося с фильтрами, определяли с помощью сцинтилляционного радиометра, для этого фильтры помещали в сцинтиллятор на основе оксазолил бензола и дифенилоксазола.

Флуориметрия рибосомных комплексов. Для изучения кинетики связывания мадумицина II с рибосомными комплексами, содержащими флуоресцентную метку ВРУ, использовали метод флуоресцентной спектроскопии. Инициаторные комплексы или посттранслокационные комплексы помещали в термостатируемую кювету флуориметра при температуре 37 °С и измеряли спектр флуоресценции ВРУ в отсутствие мадумицина II. Далее к рибосомным комплексам добавляли мадумицин II (концентрации антибиотика составляли 0,5 мкМ, 1 мкМ, 3,2 мкМ, 5 мкМ) и проводили измерения спектров флуоресценции ВРУ спустя 0,5 мин, 1,5 мин, 3 мин, 5 мин, 10 мин, 20 мин, 30 мин, 40 мин, 50 мин, 60 мин их инкубации. В случае, когда к рибосомным комплексам добавляли тройные комплексы, инкубацию продолжали

и дальнейшие измерения спектров флуоресценции ВРУ проводили спустя 0,5 мин, 1,5 мин, 3 мин, 5 мин, 10 мин, 20 мин, 30 мин, 40 мин, 50 мин, 60 мин после добавления тройного комплекса.

Флуоресценцию ВРУ возбуждали светом длиной волны 480 нм, регистрацию спектров производили в диапазоне 490-600 нм. Измерения производили с помощью спектрофлуориметра F-7000 (Hitachi). Полученные данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism 6.0. Добавление мадумидина II и тройных комплексов к рибосомным комплексам приводило к снижению концентрации флуоресцентной метки, связанной с рибосомами, а, следовательно, к снижению интенсивности флуоресцентного сигнала. Учет данных изменений был выполнен путем умножения интенсивности флуоресценции на величину, соответствующую степени разбавления рибосомных комплексов.

Спектральный максимум ВРУ располагался на длине волны 516 нм, и изменения его интенсивности в ходе эксперимента по связыванию мадумидина и рибосомных комплексов описывали экспоненциальным уравнением

$$F = F_{\infty} + A \times \exp(-k_{app} \times t),$$

где F – сигнал флуоресценции во времени t , F_{∞} – конечная амплитуда интенсивности флуоресценции, A – амплитуда изменения интенсивности, которую можно описать как $F_0 - F_{\infty}$ (F_0 – интенсивность флуоресценции в момент времени $t=0$), k_{app} – кажущаяся константа скорости реакции.

3. Результаты

3.1. Поиск и идентификация штаммов дрожжей, проявляющих антибактериальную активность

С помощью разработанной нами методики анализа антибактериальной активности с применением репортерного бактериального штамма мы осуществили поиск дрожжевых организмов коллекции ОМРБ ПИЯФ, метаболиты которых проявляют противомикробные свойства.

Мы провели скрининг 600 культуральных жидкостей дрожжевых штаммов. Около 200 образцов с разной эффективностью приводили к снижению темпов бактериального роста, но индукции репортерных сигналов SOS ответа и ингибирования трансляции в присутствии исследуемых образцов обнаружено не было. При этом антибиотики налидиксовая кислота и тетрациклин приводили к снижению темпов бактериального роста и к индукции репортерных сигналов SOS ответа и ингибирования трансляции, соответственно (рис. 4, А-Е).

Культуральные жидкости штаммов 1249, 1253, 1255 оказались в числе образцов, проявивших наибольший эффект ингибирования бактериального роста в течение 5 часов наблюдения. Эффект ингибирования сохранялся спустя 24 часа инкубации клеток репортерного штамма в присутствии данных образцов (рис. 4, Ж-И).

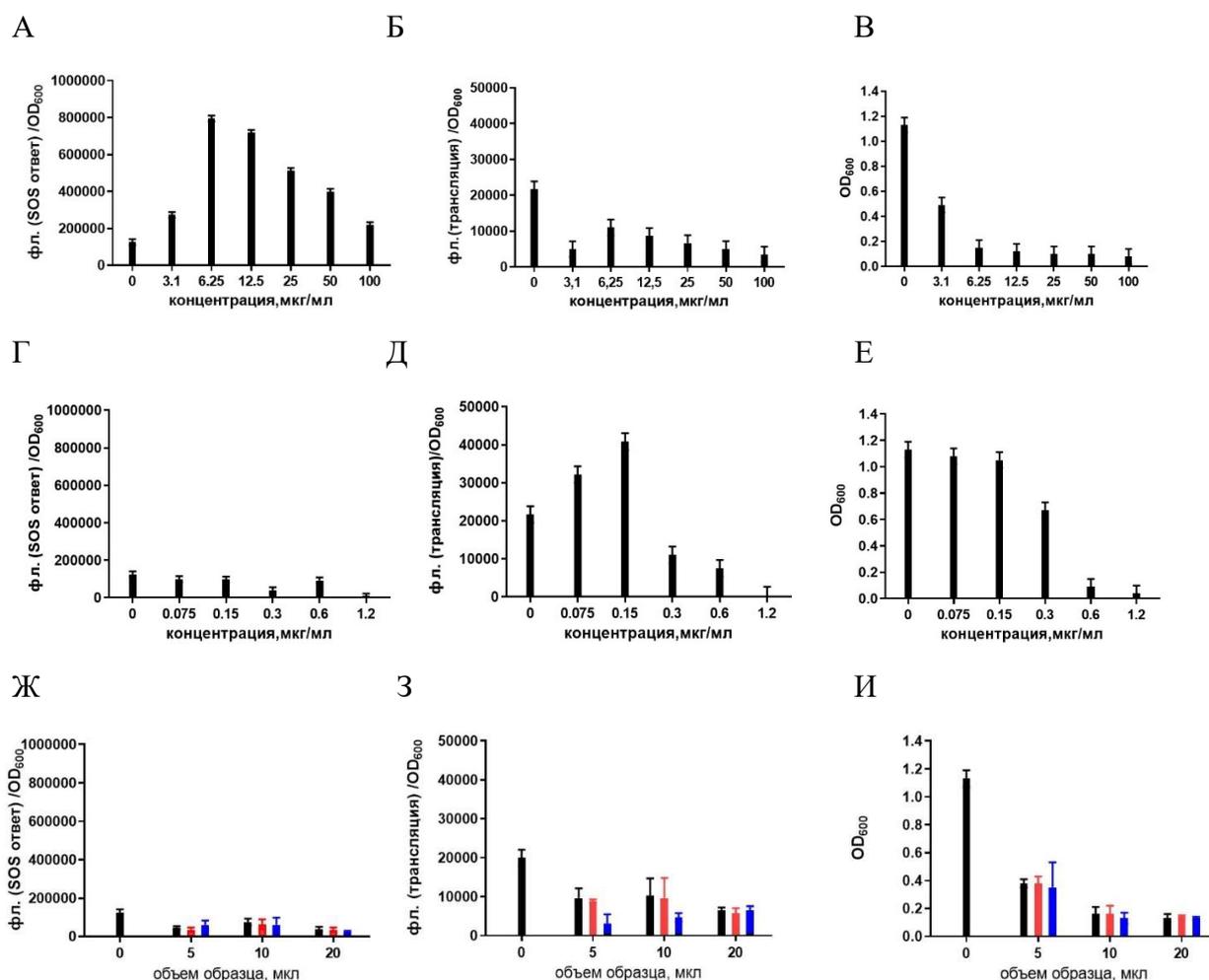


Рисунок 4 – Уровни репортерных сигналов и значения OD₆₀₀ клеток репортерной системы спустя 24 часа инкубации в присутствии контрольных антибиотиков и образцов 1249, 1253, 1255. А), Б), В) в присутствии налидиксовой кислоты. Г), Д), Е) в присутствии тетрациклина. Ж), З), И) в присутствии 1249 (черный), 1253 (красный), 1255 (синий). Обозначения: фл. – сигнал флуоресценции.

Отсутствие индукции репортерных сигналов при исследовании образцов культуральных жидкостей может быть объяснено, к примеру, следующими причинами: данные образцы не влияют на биосинтез ДНК и белка; биоактивные компоненты культуральных жидкостей влияют на биосинтез ДНК или белка, но репортерная система не чувствительна к их воздействию.

Мы произвели таксономическую идентификацию штаммов 1249, 1253, 1255, продукты метаболизма которых проявили антибактериальную активность. Результаты таксономической идентификации последовательностей регионов ITS1-5.8S-ITS2 и D1/D2 26S рДНК представлены в таблице 1.

Исследуемые штаммы являются представителями рода *Cryptococcus*, или *Naganishia* (синонимичные названия одного рода [40]). Анализ нуклеотидных последовательностей внутреннего транскрибируемого региона ITS1-5.8S-ITS2 выявил большее число возможных близкородственных видов, к которым могут относиться данные штаммы, чем анализ последовательностей доменов D1/D2 области 26S рДНК.

Штаммы 1249 и 1253 являются представителями одного вида *Cryptococcus (Naganishia) albidosimilis*, и их нуклеотидные последовательности практически совпадали. Штамм 1255 с одинаковой вероятностью является представителем вида *Cryptococcus (Naganishia) diffluens* или *Cryptococcus (Naganishia) adeliensis*.

Таблица 1 – Результаты таксономической идентификации штаммов 1249, 1253, 1255.

Штамм	D1/D2 26S рДНК (% идентичности) / номер последовательности в BLAST	ITS1-5.8S-ITS2 (% идентичности) / номер последовательности в BLAST
1249	<i>Naganishia albidosimilis</i> (99,84%) / KY108602.1	<i>Naganishia liquefaciens</i> (99,35%) / MG722803.1 <i>Naganishia adeliensis</i> (99,35%) / KY218664.1 <i>Cryptococcus albidosimilis</i> (99,35%) / AF145331.1
1253	<i>Naganishia albidosimilis</i> (100%) / KY108602.1	<i>Naganishia liquefaciens</i> (100%) / MG722803.1 <i>Naganishia adeliensis</i> (100%) / KY218664.1 <i>Naganishia albidosimilis</i> (100%) / LC191387.1 <i>Cryptococcus albidus</i> (100%) / KP131887.1
1255	<i>Naganishia diffluens</i> (100%) / KY108612.1 <i>Cryptococcus adeliensis</i> (100%) / JX188117.1	<i>Cryptococcus adeliensis</i> (100%) / MN371854.1 <i>Cryptococcus albida</i> (100%) / MG020711.1 <i>Cryptococcus albidus</i> (100%) / KJ589643.1 <i>Cryptococcus diffluens</i> (100%) / KY104327.1

Согласно данным исследования микроорганизмов рода *Cryptococcus (Naganishia)* наименьший процент идентичности нуклеотидных последовательностей ДНК, достаточный, чтобы утверждать, что исследуемые штаммы дрожжей относятся к указанному роду, составляет 99,21% в регионе ITS1-5.8S-ITS2 и 99,51% в регионе D1/D2 26S рДНК [41]. Проценты идентичности, соответствующие нашим данным, превышают 99,35% для региона ITS1-5.8S-ITS2 и 99,84% для региона D1/D2 26S рДНК, что свидетельствует о корректности проведенной нами таксономической идентификации.

Штаммы 1249, 1253 и 1255 – представители рода *Cryptococcus (Naganishia)* – были обнаружены на Курильских островах и Камчатке. Ранее была показана антимикробная активность штаммов видов *Cryptococcus (Naganishia) albida* и *Cryptococcus (Naganishia) diffluens* в отношении бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus capitis* [42]. Описанные штаммы были обнаружены в регионе щелочного озера Вади Эль-Натрун в Египте. Несмотря на значительные географические отличия в местах обитания данных штаммов и штаммов нашей коллекции, эти результаты согласуются с полученными нами.

Мы создали музей коллекции дрожжей и дрожжеподобных грибов и поместили в него 1700 штаммов. Создание музея позволит сохранить уникальные микроорганизмы для будущих

исследований, в том числе направленных на обнаружение новых антибактериальных соединений.

3.2. Исследование антибактериального механизма действия вещества «984»

Мы провели исследование вещества «984» с помощью разработанной нами методики анализа антибактериальной активности с применением репортерного бактериального штамма. Химически синтезированное вещество «984» имеет в своей структуре 5-нитрофурановую группу, что позволило предположить наличие у него противомикробных свойств.

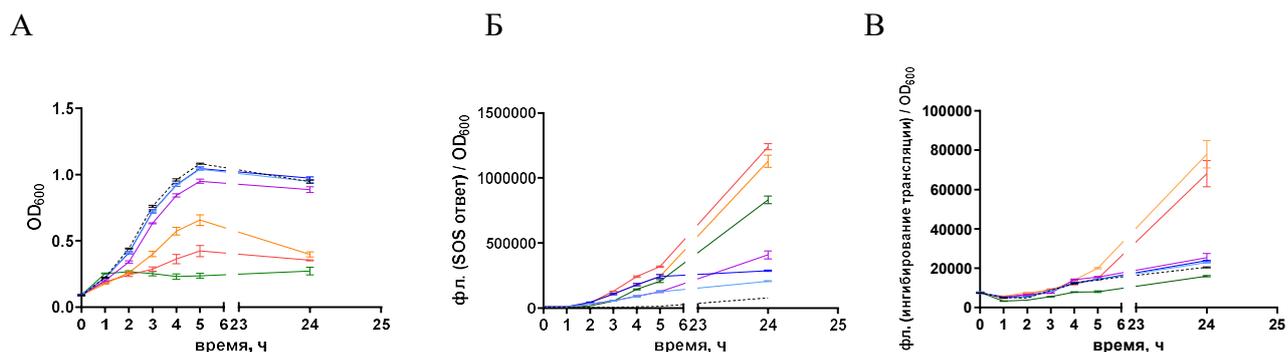


Рисунок 5 – Динамика антибактериальной активности вещества «984» с использованием репортерной системы в течение 24 часов инкубации. Зависимость от времени: А) Оптической плотности на длине волны 600 нм OD₆₀₀. Б) Нормированного на OD₆₀₀ сигнала флуоресценции репортерного белка активации SOS ответа. В) Нормированного на OD₆₀₀ сигнала флуоресценции репортерного белка ингибирования трансляции. Обозначения: фл. – сигнал флуоресценции; цветом показаны разные концентрации вещества «984»: штриховая линия – 0 мкг/мл, голубая – 9 мкг/мл, синяя – 18 мкг/мл, фиолетовая – 37 мкг/мл, оранжевая – 73 мкг/мл, розовая – 146 мкг/мл, зеленая – 293 мкг/мл.

Спустя 1 час инкубации клеток репортерного штамма с веществом «984» в концентрациях выше 37 мкг/мл наблюдался эффект ингибирования бактериального роста (рис. 5, А). Эффект ингибирования длился в течение всего времени эксперимента и возрастал с увеличением концентрации вещества. При концентрации 293 мкг/мл вещество «984» полностью подавляло рост клеток. В концентрациях ниже 37 мкг/мл вещество не приводило к ингибированию клеточного роста. Таким образом, можно оценить концентрацию полумаксимального ингибирования вещества «984»: в течение 5 часов инкубации культуры клеток с веществом данная концентрация близка к 73 мкг/мл.

Спустя 1 час инкубации клеток репортерного штамма в присутствии вещества «984» наблюдался рост интенсивности флуоресцентного сигнала активации SOS ответа (рис. 5, Б). Возрастание флуоресцентного репортерного сигнала длилось в течение 24 часов инкубации для концентраций вещества выше 37 мкг/мл, а при более низких концентрациях – в течение первых 5 часов инкубации. Интенсивность репортерного сигнала возрастала с увеличением концентрации вещества «984», однако интенсивность репортерного сигнала, соответствующая концентрации 293 мкг/мл, не подчинялась данной зависимости.

Спустя 4 часа инкубации клеток репортерного штамма в присутствии вещества «984» наблюдался рост интенсивности флуоресцентного сигнала, соответствующего ингибированию трансляции (рис. 5, В). Данный эффект наблюдался для концентраций 73 мкг/мл и 146 мкг/мл. Интенсивности репортерного сигнала флуоресценции при концентрациях вещества от 0 мкг/мл до 37 мкг/мл совпадали, а интенсивность сигнала, соответствующая концентрации 293 мкг/мл, была ниже уровня сигнала флуоресценции, который соответствовал образцу без добавления вещества «984».

Увеличение репортерного сигнала, соответствующего SOS ответу, в присутствии вещества «984» могло быть обусловлено нарушениями структуры ДНК, нарушениями процесса репликации или процесса транскрипции.

Увеличение репортерного сигнала, соответствующего ингибированию трансляции, в присутствии вещества «984» могло быть обусловлено непосредственным влиянием соединения на компоненты трансляционной системы. Но доля рибосом в клетке *E. coli* составляет порядка 30% сухой клеточной массы [43], следовательно, вероятность возникновения контактов между веществом «984» и рибосомой или другими компонентами системы биосинтеза белка высока. Это, возможно, приводило бы к ингибированию веществом «984» процесса трансляции быстрее, чем спустя 4 часа инкубации. Вероятно, нарушение процесса биосинтеза белка в присутствии вещества «984» могло произойти в результате непосредственного влияния данного вещества на процесс транскрипции. Это привело бы к нехватке компонентов для системы трансляции. Аналогичный эффект оказывают антибиотики рифамицины [44].

Таким образом, решили изучить влияние вещества «984» на процессы репликации и транскрипции.

ПЦР моделирует процесс репликации в условиях *in vitro*. Преимуществом данной реакции является малое количество компонентов, главные из которых – ДНК-полимераза и ДНК. Мы провели исследование активности ДНК-полимераз Pfu (рис. 6, А) и PfuS (рис. 6, Б) в присутствии вещества «984». Основным ПЦР продуктом являлась ДНК длиной 116 нуклеотидов, соответствующая последовательности MVF-мРНК. В контрольном образце без добавления тестируемого соединения и в образце с концентрацией вещества 9,4 мкг/мл наблюдали образование ПЦР продукта. При концентрациях вещества выше 9,4 мкг/мл ПЦР продукт не образовался. В контрольном образце также наблюдали образование побочных продуктов реакции, которые отсутствовали в образцах с добавлением вещества «984». Также в контрольном образце наблюдали присутствие нескольких полос, соответствующих матричной ДНК, а в образцах с добавлением тестируемого соединения наблюдали одну полосу, соответствующую матричной ДНК.

Если бы механизм действия вещества «984» состоял в дестабилизации взаимодействия ДНК-полимеразы с ДНК, то, вероятно, ингибирование активности фермента PfuS тестируемым соединением происходило бы при более высоких концентрациях, чем ингибирование активности фермента Pfu, поскольку полимераза PfuS содержит дополнительный ДНК-удерживающий домен. Тем не менее, мы не наблюдали различия в ингибировании данных ДНК-полимераз веществом «984».

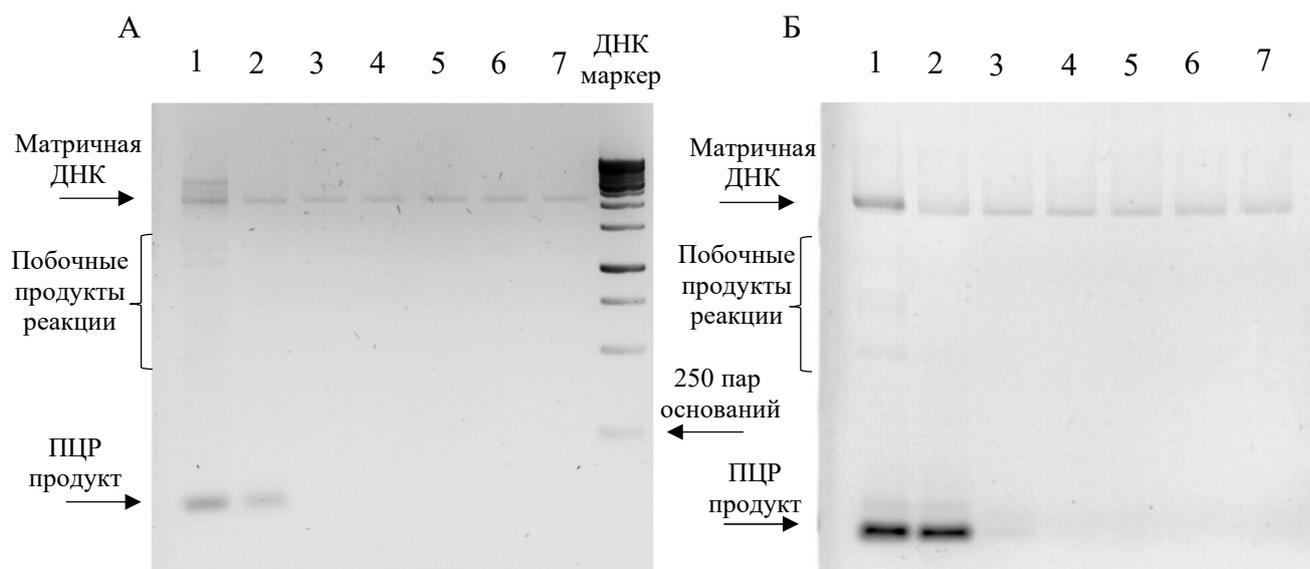


Рисунок 6 – Визуализация продуктов ПЦР, проведенной с использованием полимеразы Pfu (А) и PfuS (Б) в присутствии вещества «984». Номера дорожек соответствуют концентрациям вещества «984»: 1 – 0 мкг/мл, 2 – 9,4 мкг/мл, 3 – 18,8 мкг/мл, 4 – 37,5 мкг/мл, 5 – 75 мкг/мл, 6 – 150 мкг/мл, 7 – 300 мкг/мл.

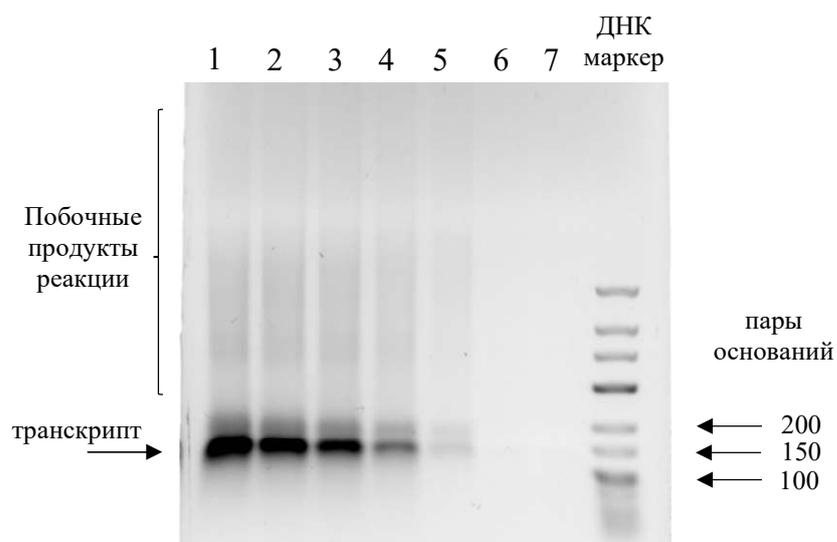


Рисунок 7 – Визуализация продуктов транскрипции, проведенной с использованием полимеразы T7 в присутствии вещества «984». Номера дорожек соответствуют концентрациям вещества «984»: 1 – 0 мкг/мл, 2 – 9,4 мкг/мл, 3 – 18,8 мкг/мл, 4 – 37,5 мкг/мл, 5 – 75 мкг/мл, 6 – 150 мкг/мл, 7 – 300 мкг/мл.

Изменение количества полос, соответствующих матричной плазмидной ДНК, и снижение их интенсивности на электрофореграмме в присутствии вещества «984», возможно, свидетельствует в пользу того, что данное соединение конкурирует с молекулами красителя – бромистого этидия за связывание с ДНК.

In vitro транскрипция с использованием полимеразы T7 моделирует процесс транскрипции *in vivo* у *E. coli*. Главными компонентами такой реакции являются ДНК и РНК-полимераза. Провели исследование активности РНК-полимеразы T7 в реакции *in vitro* транскрипции в присутствии вещества «984» (рис. 7).

Основным продуктом транскрипции являлась MVF-мРНК длиной 93 нуклеотида. Наблюдали уменьшение количества основного и побочного продуктов реакции с ростом концентрации тестируемого соединения. При концентрациях 150 мкг/мл и 300 мкг/мл вещества «984» продукты реакции отсутствовали. Положение линий, соответствующих целевому продукту, не изменялось, что может свидетельствовать в пользу снижения веществом «984» эффективности транскрипции, а не в пользу повышения тестируемым соединением вероятности ошибки транскрипции.

Можно предположить, что молекулы вещества «984» в бактериальных клетках репортерного штамма подвергались нитроредукции и азоредукции [17]. В результате таких процессов могли образоваться электрофильные ионы нитрения, супероксидные радикалы, гидроксид-анионы и другие биологически активные молекулы. Данные метаболиты приводят к нарушениям структуры нуклеиновых кислот и белков, а также к нарушениям процессов репликации, транскрипции и трансляции, чему мы и нашли косвенные подтверждения в виде возрастания репортерных сигналов флуоресценции, соответствующих активации SOS ответа и ингибированию биосинтеза белка.

При проведении ПЦР и *in vitro* транскрипции ингибирующая активность вещества «984» могла быть обусловлена взаимодействием его супрамолекулярных комплексов, образованных азолазиновыми группами, с белком-мишенью – полимеразой. Ингибирование веществом «984» ПЦР происходило при более низких концентрациях, чем ингибирование процесса транскрипции. Возможно, молекулы данного вещества предпочтительнее взаимодействуют с аминокислотами, экспонированными на поверхности ДНК-полимеразы Pfu, чем на поверхности РНК-полимеразы T7.

Поскольку вещество «984» ингибировало ПЦР и *in vitro* транскрипцию, можно предположить, что тестируемое соединение также способно влиять на процессы репликации и транскрипции в условиях *in vivo*.

3.3. Исследование молекулярного механизма действия антибиотика мадумицина II

Мы провели исследование влияния антибиотика мадумицина II на прокариотическую систему трансляции. Для этого мы изучали парциальные реакции трансляции с использованием радиоактивного и флуоресцентного репортеров [¹⁴C]Val-тРНК^{Val} и ВРУ-Met-тРНК^{fMet}. Замена формильной группы тРНК на флуоресцентно меченый ВРУ не влияет на функциональные свойства тРНК [45].

Мадумицин II связывается с рибосомой в ПТЦ и при этом оказывается в непосредственной близости от аминокислоты fMet инициаторной тРНК, расположенной в Р сайте рибосомы. Таким образом, мадумицин II, связываясь с инициаторными комплексами, содержащими флуоресцентный репортер, может влиять на микроокружение репортера и приводить к изменению интенсивности его флуоресценции.

Инициаторные комплексы инкубировали с мадумицином II в течение 1 часа, при этом проводили регистрацию спектров флуоресценции метки ВРУ. Концентрация инициаторного

комплекса составляла 0,2 мкМ, а концентрация мадумицина II в образцах варьировалась от 0,5 мкМ до 5 мкМ. В отсутствие антибиотика изменения в спектре флуоресценции не наблюдались (рис. 8, А). В присутствии мадумицина II интенсивность спектрального максимума возрастала и выходила на насыщение спустя 50 мин при концентрации антибиотика 0,5 мкМ, спустя 40 мин при концентрации 1 мкМ, спустя 20 мин при концентрации 3,2 мкМ, спустя 10 мин при концентрации 5 мкМ. Конечные амплитуды нормированных кривых зависимости интенсивности максимума спектров от времени возрастали с увеличением концентрации мадумицина II и достигали наибольших значений для концентраций антибиотика 3,2 мкМ и 5 мкМ. Таким образом можно утверждать, что мадумицин II вызывает значительные изменения сигнала флуоресценции при взаимодействии с инициаторными комплексами, содержащими флуоресцентно меченую инициаторную тРНК в Р сайте.

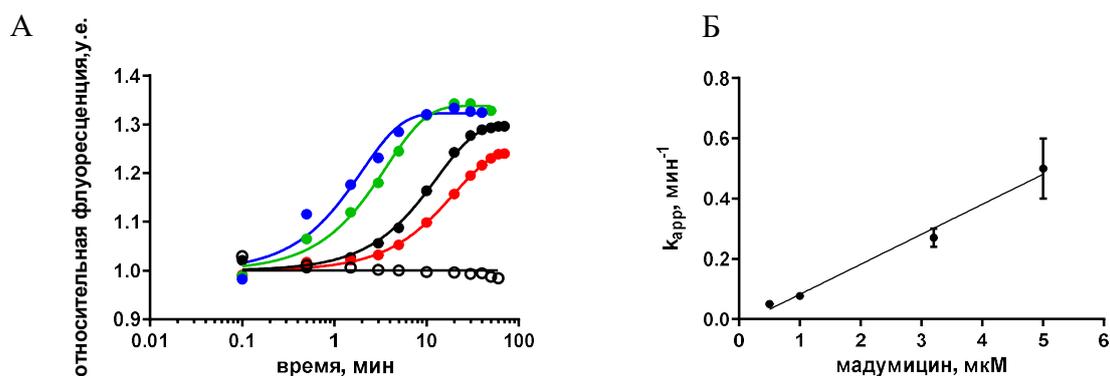


Рисунок 8 — Кинетика взаимодействия мадумицина II с инициаторными комплексами. А) Нормированный график зависимости интенсивности максимума спектров инициаторных комплексов, содержащих флуоресцентную метку ВРУ, от времени инкубации комплексов с мадумицином в следующих концентрациях 0 мкМ (выколотые кружки), 0,5 мкМ (красный), 1 мкМ (черный), 3,2 мкМ (зеленый), 5 мкМ (синий). Б) Зависимость величины кажущейся константы скорости связывания k_{app} мадумицина с инициаторным комплексом от концентрации мадумицина.

Мы обнаружили, что значение кажущейся константы скорости взаимодействия мадумицина II с инициаторными комплексами линейно возрастает с увеличением концентрации антибиотика (рис. 8, Б), и, следовательно, отражает реакцию связывания мадумицина II с рибосомами. Константа скорости прямой реакции взаимодействия антибиотика с инициаторными комплексами составила $k_{on} = 0,10 \pm 0,01 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1} = 0,0017 \pm 0,0002 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$. Константа скорости обратной реакции близка к нулю. Разница уровней насыщения сигнала флуоресценции при разных концентрациях мадумицина II указывает на относительно высокие значения константы диссоциации данного комплекса. Примечательно, что константа скорости ассоциации антибиотика вирджиниамицина М, принадлежащего к группе стрептограминов А, и 50S субъединицы рибосомы составляет $k_{on} = 0,014 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ [46], то есть на порядок больше константы скорости ассоциации для мадумицина. Это позволяет утверждать, что мадумицин II связывается с инициаторными комплексами достаточно медленно.

Для изучения влияния мадумицина II на количество образующегося дипептида инициаторные комплексы инкубировали с мадумицином II в течение 1 часа. Концентрация

инициаторного комплекса составляла 0,2 мкМ, а концентрация мадумицина II в образцах варьировалась от 0,5 мкМ до 5 мкМ. После этого к смеси добавляли тройной комплекс, содержащий Val-тРНК^{Val}, и инкубировали в течение 5 мин. В результате образовывался дипептид Met-Val, количество которого определяли по содержанию в нем радиоактивно меченой аминокислоты. Количество рибосом, с которыми связался тройной комплекс, определяли сорбцией рибосомных комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах.

В отсутствие антибиотика доля рибосомных комплексов, связавших тройной комплекс, составила 71% от всех рибосом в образце, при этом 69% из них образовали дипептид (рис. 9, А).

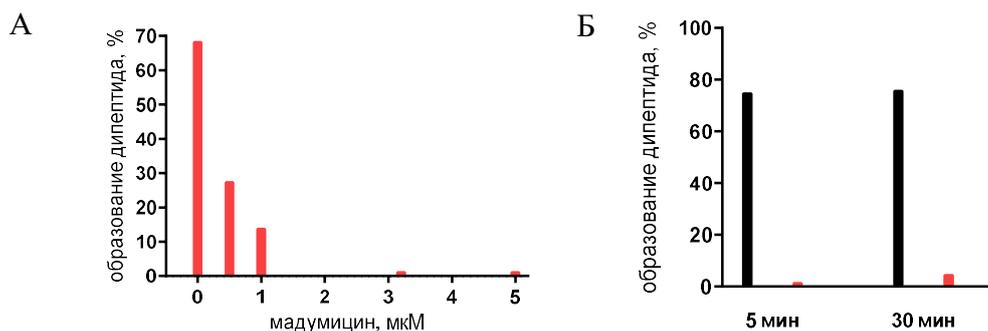


Рисунок 9 — Зависимость количества образованного дипептида А) от концентрации мадумицина II, Б) от времени инкубации инициаторных комплексов, преинкубированных с 3,2 мкМ мадумицином II (красные столбцы) и без мадумицина II (черные столбцы), с тройным комплексом. Количество дипептида оценивалось относительно количества рибосом, с которыми связался тройной комплекс в отсутствие антибиотика спустя 5 мин инкубации рибосомных комплексов с тройными.

С увеличением концентрации мадумицина II количество образовавшегося дипептида в образцах снижалось. При концентрации антибиотика 0,5 мкМ количество дипептида было в 2,5 раза меньше относительно количества дипептида в отсутствие тестируемого вещества, а при концентрации 1 мкМ – в 5 раз меньше. При концентрациях мадумицина II 3,2 мкМ и 5 мкМ дипептид практически не образовывался. Увеличение времени инкубации мадумицин-связанного инициаторного комплекса с тройным комплексом с 5 мин до 30 мин привело к некоторому увеличению количества образованного дипептида, концентрация мадумицина II при этом составляла 3,2 мкМ (рис. 9, Б).

Ранее в аналогичном эксперименте показали, что при концентрации мадумицина II 3,2 мкМ дипептид образовался менее, чем за 5 мин инкубации, при этом количество дипептида в образце составляло порядка 40% [23]. Такое отличие результатов можно объяснить введением нами дополнительного этапа инкубации инициаторных комплексов с мадумицином II, что было обусловлено низкой скоростью связывания антибиотика с рибосомами. Константа скорости начального связывания тройного комплекса с инициаторным составляет $140 \pm 20 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [47], что минимум в 80 000 раз больше определенной нами константы скорости ассоциации мадумицина II и инициаторного комплекса. Скорость распознавания молекулой тРНК в составе тройного комплекса кодона мРНК составляет $190 \pm 20 \text{ сек}^{-1}$ при $20 \text{ }^\circ\text{C}$, скорость активации ГТФазной активности фактора EF-Tu и последующего гидролиза ГТФ составляет $250 \pm 60 \text{ сек}^{-1}$

при 20 °С [47]. Скорость перехода между стадией гидролиза ГТФ и стадией образования первой пептидной связи равна $33 \pm 3 \text{ сек}^{-1}$ при 20 °С [48]. Таким образом, связывание тройного комплекса с рибосомой и образование дипептида происходит значительно быстрее, чем связывание мадумицина II с рибосомой.

Для дальнейшего анализа рибосомных комплексов в присутствии мадумицина II изучили спектральные изменения, происходящие при добавлении тройного комплекса к мадумицин-связанному инициаторному.

Добавление тройного комплекса к инициаторному комплексу в отсутствие антибиотика приводит к значительному возрастанию интенсивности спектрального максимума в течение первых 5 мин инкубации, а затем интенсивность равномерно снижается (рис. 10, А). Добавление тройного комплекса к мадумицин-связанному инициаторному комплексу приводит к постепенному возрастанию интенсивности спектрального максимума, и данный процесс выходит на насыщение спустя 20 мин инкубации. Эти данные согласуются с результатами пептидного анализа (рис. 9, Б), которые показывают, что за 30 мин инкубации тройного комплекса с инициаторным в присутствии мадумицина II происходит некоторое повышение количества дипептида относительно уровня, наблюдаемого спустя 5 мин инкубации.

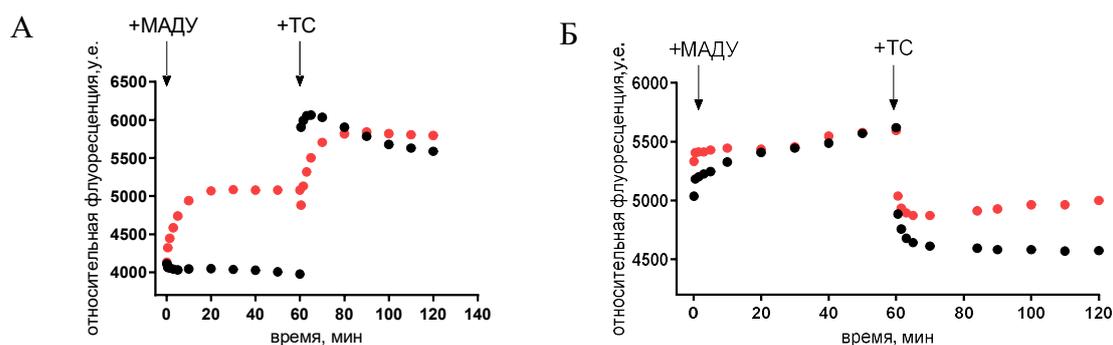


Рисунок 10 – Изменение интенсивности спектральных максимумов флуоресцентно меченых рибосомных комплексов в процессе их преинкубации с мадумицином (начиная со времени 0 мин, +МАДУ) в концентрациях 0 мкМ (черные кружки) и 3,2 мкМ (красные кружки) и дальнейшего взаимодействия с тройным комплексом (начиная со времени 60 мин, +ТС). А) В качестве рибосомных комплексов выступают инициаторные комплексы. Б) В качестве рибосомных комплексов выступают посттранслокационные комплексы.

Можно предположить, что спектральный максимум в данном случае достигается при образовании пептидной связи. В образце без мадумицина II дальнейшее равномерное снижение интенсивности флуоресценции может отражать наличие конформационной подвижности в пептидилтрансферазном центре рибосомы. Стабилизация интенсивности флуоресценции через 20 мин после добавления тройного комплекса к мадумицин-связанному инициаторному комплексу, вероятно, свидетельствует о блокировании антибиотиком конформационной подвижности.

Далее изучили спектральные изменения, происходящие в системе трансляции в процессе формирования второй пептидной связи в присутствии мадумицина II.

Посттранслокационные комплексы, в Р сайте которых располагался флуоресцентно меченый дипептид Met-Val, инкубировали с мадумицином II в течение 1 часа, и при этом

производили регистрацию спектров флуоресценции. Концентрация рибосом в образцах составляла 0,2 мкМ, концентрация мадумицина II была 0 мкМ и 3,2 мкМ. Концентрация рибосомных комплексов, содержащих дипептид, была равной 0,1 мкМ. К рибосомным комплексам добавляли тройной комплекс, содержащий Phe-тРНК^{Phe} и инкубировали в течение последующего часа, при этом производили регистрацию спектров флуоресценции.

Добавление мадумицина II к посттранслокационному комплексу не приводило к изменению интенсивности флуоресцентного сигнала (рис. 10, Б). Это свидетельствует о том, что связывание антибиотика с таким комплексом слабо влияет на микроокружение дипептида. Дальнейшее добавление тройного комплекса приводит к изменению уровня флуоресценции как в присутствии мадумицина II, так и в его отсутствие, однако, при наличии в системе ингибитора амплитуда падения уровня флуоресценции после добавления тройного комплекса примерно в 1,5 раза меньше, чем в контрольном образце.

Описанные изменения свидетельствуют в пользу того, что взаимодействие между мадумицином II и посттранслокационным комплексом с дипептидил-тРНК в Р сайте существует, но данное взаимодействие не приводит к значительным конформационным изменениям, которые наблюдаются в случае связывания мадумицина II с инициаторными комплексами (рис. 10, А).

Провели оценку количества образующегося в системе трипептида Met-Val-Phe спустя 5 мин и 30 мин после добавления тройного комплекса, содержащего Phe-тРНК^{Phe}. Количество рибосомных комплексов, содержащих радиоактивно меченый дипептид до добавления тройного комплекса, оценили как сумму ди- и трипептида в образце после добавления тройного комплекса.

Трипептид образовывался менее, чем за 5 мин, при этом его количество было в 1,2 раза меньше в присутствии мадумицина II, чем в отсутствие антибиотика (рис. 11). Это согласуется с результатами, полученными с помощью метода флуориметрии (рис. 10, Б), и указывает на то, что мадумицин II оказывает слабое ингибирующее действие на образование второй пептидной связи.

Поскольку связывание мадумицина II с рибосомой слабо меняет конформацию посттранслокационного комплекса, но значительно влияет на конформацию инициаторного комплекса, необходимо было выяснить, имеет ли принципиальное значение последовательность связывания инициаторной тРНК и мадумицина II с рибосомой.

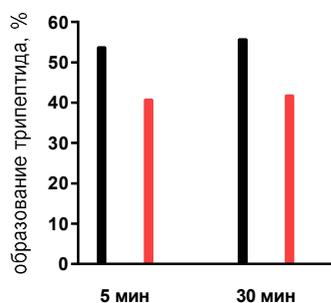


Рисунок 11 – Кинетика образования трипептида в присутствии мадумицина II (красный) и в отсутствие антибиотика (черный). Количество трипептида (Met-Val-Phe) оценивалось относительно количества рибосом, содержащих дипептид до добавления тройного комплекса.

Образцы рибосом перед добавлением к ним компонентов для формирования инициаторного комплекса (без флуоресцентной метки) инкубировали в течение 1 часа: один образец рибосом инкубировали в присутствии мадумицина II, второй образец инкубировали без антибиотика. Третий образец рибосом не подвергали предварительной инкубации. Концентрация рибосом составляла 4,9 мкМ, а концентрация мадумицина II в системе была 49 мкМ. Данные образцы рибосом смешивали с компонентами для формирования инициаторного комплекса и инкубировали в течение 1 часа. Инициаторные комплексы с рибосомами, не подвергавшимися предварительной инкубации, смешивали с мадумицином II и инкубировали в течение 1 часа.

Полученные таким образом рибосомные комплексы смешивали с тройным комплексом, содержащим Val-тРНК^{Val}, и инкубировали. Спустя 5 мин и 30 мин инкубации оценивали количество образовавшегося дипептида, количество связанной с А сайтом рибосом радиоактивно меченой аминоксил-тРНК, а также общего количества радиоактивно меченой аминоксилоты в образце.

Количество радиоактивно меченой аминоксил-тРНК, связанной с рибосомными комплексами, не изменялось с увеличением времени инкубации тройного комплекса с инициаторными с 5 мин до 30 мин (рис. 12, А). В образцах с мадумицином II количество радиоактивно меченой аминоксилоты было в 4 раза меньше, чем в образце без антибиотика.

Весь дипептид в образце без антибиотика образовался в течение первых 5 мин инкубации. В образцах с мадумицином II дипептид отсутствовал спустя 5 мин инкубации, но при этом малое количество дипептида образовывалось спустя 30 мин инкубации, и его количество в образцах совпадало. Количество дипептида оценивали относительно количества рибосом, с которыми связался тройной комплекс в отсутствие мадумицина II (рис. 12, Б).

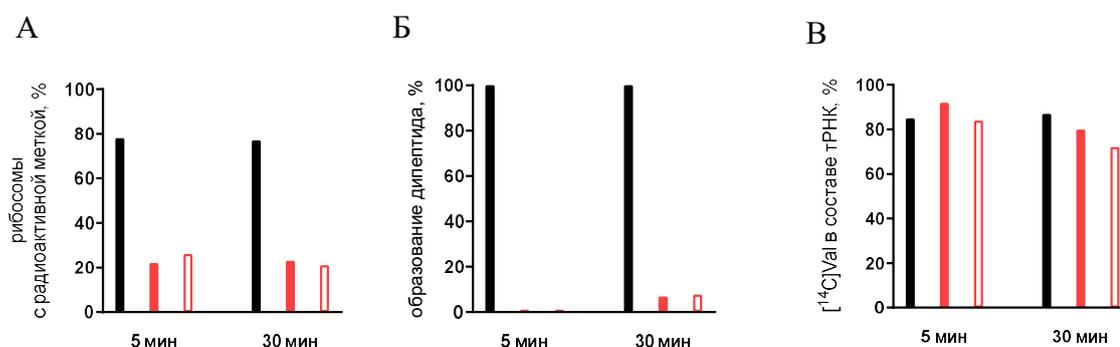


Рисунок 12 – Влияние мадумицина II на формирование функционального инициаторного комплекса. А) Количество радиоактивно меченой Val-тРНК^{Val}, связанной с инициаторным комплексом. Б) Количество образованного дипептида (fMet-Val) в системе. Количество дипептида оценивалось относительно количества рибосом, с которыми связался тройной комплекс в отсутствие мадумицина II. В) Количество радиоактивно меченого Val, связанного с тРНК, в комплексе. Количество радиоактивно меченой аминоксилоты оценивалось относительно количества тройного комплекса, добавленного в систему. Обозначения: РИБ – рибосомы, МАДУ – мадумицин II, ТС – тройной комплекс, миксIC – смесь компонентов для формирования IC, без рибосом. Черным обозначены данные для образцов с порядком добавления компонентов (РИБ) + миксIC + ТС (контрольный образец без антибиотика). Красные столбики обозначают данные для образцов с порядком добавления компонентов (РИБ + миксIC) + МАДУ + ТС. Пустые столбики с красной границей обозначают данные для образцов с порядком добавления компонентов (РИБ + МАДУ) + миксIC + ТС.

В течение 30 мин инкубации количество связанного с тРНК радиоактивно меченого валина в образцах практически не изменилось (рис. 12, В).

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что эффект ингибирования образования первой пептидной связи сохраняется вне зависимости от того, в какой момент был добавлен мадумицин II: к рибосомам перед добавлением компонентов для формирования инициаторного комплекса или к функциональному инициаторному комплексу перед добавлением тройного комплекса. Также было показано, что наличие мадумицина II приводит к снижению связывания тРНК в А сайт рибосомы.

Таким образом, можно предположить, что ингибирующее действие мадумицина связано с нарушением конформации рибосомного комплекса, в результате которого снижается количество тРНК, доставляемой в А сайт рибосомы, а также блокируется образование первой пептидной связи.

4. Заключение

В данной работе мы произвели поиск антибактериальных веществ природного происхождения среди метаболитов природных штаммов дрожжей коллекции ОМРБ ПИЯФ, изучили антибактериальный механизм действия химически синтезированного соединения «984» и провели исследование молекулярного механизма действия известного, но малоизученного антибиотика-ингибитора трансляции мадумицина II. Такой набор разных объектов исследования и подходов к их изучению позволил нам сформировать систему, которая предоставляет возможность углублять знания о различных веществах с антибактериальными свойствами, не ограничиваясь анализом узкой группы соединений со строго определенным набором первоначальных сведений о них.

Мы произвели поиск и таксономическую идентификацию штаммов дрожжей, метаболиты которых обладают антибактериальными свойствами. Для проведения данной работы мы использовали разработанную нами методику анализа антибактериальной активности соединений с применением репортерного бактериального штамма, который позволяет выявлять ингибиторы биосинтеза белка и активаторы SOS ответа. Таксономическая идентификация была выполнена путем секвенирования видоспецифичных нуклеотидных последовательностей ДНК дрожжевых организмов.

Мы провели анализ антимикробной активности вещества «984», которое имеет в своей структуре 5-нитрофурановую и азолазиновую группы. Для проведения данной работы мы использовали разработанную нами методику анализа антибактериальной активности соединений. Было показано, что вещество «984» ингибирует бактериальный рост репортерного штамма, а также приводит к увеличению экспрессии репортерных генов активации SOS ответа и ингибирования трансляции. С помощью *in vitro* ДНК- и РНК-полимеразных реакций в присутствии соединения «984» мы установили способность данного вещества ингибировать активность ДНК-полимераз Pfu и PfuS и РНК-полимеразы T7. Мы предположили, что вероятный механизм антибактериального действия вещества «984» в бактериальной клетке может быть

связан с преобразованиями его молекул бактериальными редуктазами в активные метаболиты, а в бесклеточной системе – с формированием супрамолекулярных комплексов.

Мы изучили влияние антибиотика мадумицина II на прокариотическую систему биосинтеза белка с помощью парциальных реакций трансляции. Для этого мы использовали биохимические методы анализа и метод флуориметрии.

Мы установили константу скорости прямой реакции взаимодействия мадумицина II с рибосомой. Исследование образования первой пептидной связи в присутствии данного антибиотика показало, что при добавлении к инициаторным комплексам мадумицина II в пептидилтрансферазном центре рибосомы происходят значительные конформационные изменения, которые, вероятно, являются причиной ингибирования образования дипептида.

Исследование образования второй пептидной связи в присутствии мадумицина II показало, что при добавлении к посттранслокационным комплексам данного антибиотика в пептидилтрансферазном центре рибосомы происходят незначительные конформационные изменения, что, вероятно, объясняет слабое влияние мадумицина II на образование трипептида.

Исследование образования функционального инициаторного комплекса в присутствии мадумицина II показало, что порядок добавления антибиотика к рибосомам – до того, как были добавлены компоненты для формирования инициаторного комплекса, или после этого – не имеет принципиального значения.

5. Выводы

1. Сформирован музей коллекции дрожжей и дрожжеподобных грибов ОМРБ ПИЯФ, и 1700 штаммов коллекции дрожжей помещены в музей коллекции.
2. Разработана методика анализа антибактериальной активности в жидкой среде с использованием репортерного бактериального штамма *E. coli*, трансформированного репортерной плазмидой pDualrep2.
3. Разработанная методика анализа антибактериальной активности в жидкой среде с использованием репортерного бактериального штамма была применена для скрининга культуральных жидкостей дрожжевых микроорганизмов коллекции ОМРБ ПИЯФ.
4. Произведена таксономическая идентификация штаммов дрожжей и дрожжеподобных грибов, продукты метаболизма которых проявили антимикробную активность.
5. Разработанная методика анализа антибактериальной активности в жидкой среде с использованием репортерного бактериального штамма была применена для определения наличия антимикробной активности вещества «984».
6. Установлено влияние вещества «984» на активность ДНК-полимераз Pfu и PfuS при проведении полимеразной цепной реакции в условиях *in vitro*.
7. Установлено влияние вещества «984» на активность РНК-полимеразы T7 при проведении реакции транскрипции в условиях *in vitro*.
8. Установлено с помощью биохимических методов анализа, что последовательность связывания мадумицина II с рибосомой – до того, как к ней были добавлены компоненты для

формирования инициаторного комплекса, или после этого – не имеет принципиального значения для проявления мадумицином II действия по ингибированию образования первой пептидной связи.

9. Определена константа скорости реакции связывания мадумицина II с рибосомными комплексами с использованием метода флуориметрии.

10. Определено влияние мадумицина II на образование первой пептидной связи с использованием биохимических методов анализа и метода флуориметрии.

11. Определено влияние мадумицина II на образование второй пептидной связи с использованием биохимических методов анализа и метода флуориметрии.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Публикации в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК

1. **Shulenina O.V.**, Yarovoy B.F., Kirillov S.V., Paleskava A., Konevega A.L. «Potential antibacterial drugs from unique collection of yeast-like fungi» // **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** (2018) 50: 467, p. 117. Impact Factor 2.548

2. **Shulenina O.V.**, Yarovoy B.F., Paleskava A., Konevega A.L. «Natural yeast-like fungi strains producing potential antibacterial agents» // **FEBS Open Bio** (2019) 9, p. 290. Impact Factor: 1.959

Тезисы международных и всероссийских конференций

1. **Шуленина О.В.**, Яровой Б.Ф., Егоров В.В., Полесскова Е.В., Коневега А.Л. «Система для поиска и анализа соединений с антибактериальной активностью» // Тезисы докладов молодежной конференции XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, 24 февраля-29 февраля 2020, с. 244-245.

2. **Шуленина О.В.**, Яровой Б.Ф., Полесскова Е.В., Коневега А.Л. «Дрожжи рода *Cryptococcus* как потенциальные продуценты антибактериальных соединений» // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 18 ноября-23 ноября 2019, с. 151-153.

3. **Шуленина О.В.**, Яровой Б.Ф., Полесскова Е.В., Коневега А.Л. «Вторичные метаболиты дрожжей как источник новых антимикробных препаратов» // Тезисы докладов молодежной конференции XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, 25 февраля-2 марта 2019, с. 291-292.

4. **Шуленина О.В.**, Яровой Б.Ф., Тимковский А.Л., Полесскова Е.В., Коневега А.Л. «Флуоресцентные репортеры в поиске новых антибактериальных препаратов» // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19 ноября-24 ноября 2018, с. 219-221.

5. **Шуленина О.В.**, Яровой Б.Ф., Кириллов С.В., Полесскова Е.В., Коневега А.Л. «Природные штаммы дрожжей в качестве потенциального источника новых

антибактериальных препаратов» // Сборник тезисов V Всероссийского молодежного научного форума Open Science 2018, 21 ноября-23 ноября 2018, с. 68-69.

6. **Shulenina O.V.**, Paleskava A., Yarovoy B.F., Konevega A.L. «Natural yeast strains as potential source of new antibacterial drugs» // Proceedings of Ribosomes and Translation meeting St. Petersburg, Russia, 13 May-16 May 2018, p. 45.

7. Касацкий П.С., **Шуленина О.В.**, Полесскова Е.В., Коневега А.Л. «Мадумицин II ингибирует образование пептидной связи, переводя пептидилтрансферазный центр в неактивное состояние» // Сборник тезисов IV ежегодного молодежного научного форума «OPEN SCIENCE 2017, 15 ноября-17 ноября 2017, с. 80.

8. **Shulenina O.V.** «Antibiotic madumycin II inhibits peptide synthesis on the ribosome» // Abstracts of Spetsai Summer School 2017 for Proteins and Organized Complexity, 24 September-1 October 2017, p. 56.

Список литературы

1. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance // *Microbiol Spectr.* 2016. Vol. 4, № 2.
2. Dodds D.R. Antibiotic resistance: A current epilogue // *Biochem Pharmacol.* 2017. Vol. 134. P. 139–146.
3. Scannell J.W., Bosley J. When Quality Beats Quantity: Decision Theory, Drug Discovery, and the Reproducibility Crisis // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 2.
4. Newman J.D., Gordon C.M., Kenneth S.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 // *J Nat Prod.* 2003. Vol. 66, № 7. P. 1022–1037.
5. Mohamed H. et al. Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities // *Int J Mol Cell Med.* 2017. Vol. 6, № 2. P. 109–120.
6. Khiralla A. et al. Endophytic fungi associated with Sudanese medicinal plants show cytotoxic and antibiotic potential // *FEMS Microbiol. Lett.* 2016. Vol. 363, № 11.
7. Cheung R.C. et al. Antifungal and antiviral products of marine organisms // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014. Vol. 98, № 8. P. 3475–3494.
8. Groenewald M. et al. Diversity of yeast species from Dutch garden soil and the description of six novel Ascomycetes // *FEMS Yeast Res.* 2018. Vol. 18, № 7.
9. Roostita L.B. et al. Determination of yeasts antimicrobial activity in milk and meat products // *Adv. J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 3, № 6. P. 442–445.
10. Younis G. et al. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria // *Vet. World.* 2017. Vol. 10, № 8. P. 979–983.
11. Egorov N.S. Antibiotics a Scientific Approach. M.: Vysshaya shkola, 1979. 1–455 p.
12. Aly A.H., Debbab A., Proksch P. Fifty years of drug discovery from fungi // *Fungal Divers.* 2011. Vol. 50, № 3.
13. Neergheen-Bhujun V. et al. Biodiversity, drug discovery, and the future of global health: Introducing the biodiversity to biomedicine consortium, a call to action // *J Glob Heal.* 2017. Vol. 7, № 2.

14. Suslov A.V. et al. Isolation and investigation of natural yeast strains resistant to heavy metals salts and radionuclides // *Radiat. Biol. Radioecol.* 2004. Vol. 44, № 5. P. 574–578.
15. Okano A., Isley N.A., Boger D.L. Peripheral modifications of [Ψ[CH₂NH]Tpg₄]vancomycin with added synergistic mechanisms of action provide durable and potent antibiotics // *PNAS.* 2017. Vol. 114, № 26. P. E5052-E5061.
16. Beliatskaya A.V. et al. Nitrofurans for external use // *Drug Dev. Regist.* 2019. Vol. 8, № 2. P. 38–47.
17. Le V.V.H. et al. Novel 5-Nitrofuranyl-Activating Reductase in *Escherichia coli* // *Antimicrob Agents Chemother.* 2019. Vol. 63, № 11. P. e00868-19.
18. Loginova S.Y. et al. Investigation of Prophylactic Efficacy of Triazavirin Against Experimental Forest-Spring Encephalitis on Albino Mice // *Antibiot. Chemother.* 2015. Vol. 60, № 5–6. P. 8–11.
19. Shvetsov A.V. et al. Triazavirine supramolecular complexes as modifiers of the peptide oligomeric structure // *J Biomol Struct Dyn.* 2018. Vol. 36, № 10. P. 2694–2698.
20. Zabrodskaya Y.A. et al. A double-edged sword: supramolecular complexes of triazavirine display multicenter binding effects which influence aggregate formation // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2018. P. 3041–3047.
21. Mccoy L.S., Xie Y., Tor Y. Antibiotics that target protein synthesis // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2011. Vol. 2, № 2. P. 209–232.
22. Wilson D.N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance // *Nat. Rev. Microbiol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 12, № 1. P. 35–48.
23. Osterman I.A. et al. Madumycin II inhibits peptide bond formation by forcing the peptidyl transferase center into an inactive state // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 12. P. 7507–7514.
24. An W.F., Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening // *Mol Biotechnol.* 2010. Vol. 45, № 2. P. 180–186.
25. Galluzzi L., Karp M. Whole cell strategies based on lux genes for high throughput applications toward new antimicrobials // *Comb Chem High Throughput Screen.* 2006. Vol. 9, № 7. P. 501–514.
26. Fan J. et al. A Novel High-Throughput Cell-Based Assay Aimed at Identifying Inhibitors of DNA Metabolism in Bacteria // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, № 12. P. 7264–7272.
27. Galluzzi L., Karp M. Amplified detection of transcriptional and translational inhibitors in bioluminescent *Escherichia coli* K-12 // *J Biomol Screen.* 2003. Vol. 8, № 3. P. 340–346.
28. Osterman I.A. et al. Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother.* 2016. Vol. 60, № 12. P. 7481–7489.
29. Ramakrishnan V.. Ribosome structure and the mechanism of translation // *Cell.* 2002. Vol. 108, № 4. P. 557–572.
30. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* Sixth edit. W.H. Freeman, 2012. 1–1328 p.
31. Antoun A. et al. How initiation factors maximize the accuracy of tRNA selection in initiation of bacterial protein synthesis // *Mol Cell.* 2006. Vol. 23, № 2. P. 183–193.
32. Schmeing T.M., Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the

- mechanism of translation // *Nature*. 2009. Vol. 461, № 7268. P. 1234–1242.
33. Laurberg M. et al. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome // *Nature*. 2008. Vol. 454, № 7206. P. 852–857.
 34. Cunha C.E. et al. Dual use of GTP hydrolysis by elongation factor G on the ribosome // *Transl*. 2013. Vol. 1, № 1. P. e24315.
 35. Milon P. et al. Transient kinetics, fluorescence, and FRET in studies of initiation of translation in bacteria // *Methods Enzym*. 2007. Vol. 430. P. 1–30.
 36. Vinogradova D.S. et al. How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs // *PLoS Biol*. 2020. Vol. 18, № 1. P. e3000593.
 37. Sampson J.R., Uhlenbeck O.C. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. Vol. 85, № 4. P. 1033–1037.
 38. Holtkamp W. et al. GTP hydrolysis by EF-G synchronizes tRNA movement on small and large ribosomal subunits // *EMBO J*. 2014. Vol. 33, № 9. P. 1073–1085.
 39. Raja H.A. et al. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community // *J Nat Prod*. 2017. Vol. 80, № 3. P. 756–770.
 40. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks [Electronic resource]. URL: <http://www.mycobank.org/>.
 41. Vu D. et al. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // *Stud Mycol*. 2016. Vol. 85. P. 91–105.
 42. Sipiczki M., Selim S.A. Antagonistic yeasts from a salt-lake region in Egypt: identification of a taxonomically distinct group of phylloplane strains related to *Sporisorium* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2019. Vol. 112, № 4. P. 523–541.
 43. Soler-Bistué A. et al. Genomic Location of the Major Ribosomal Protein Gene Locus Determines *Vibrio cholerae* Global Growth and Infectivity // *PLoS Genet*. 2015. Vol. 11, № 4. P. 1–21.
 44. Chen L.F., Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides // *Infect Dis Clin North Am*. 2009. Vol. 23, № 4. P. 1053–1075.
 45. Mittelstaet J., Konevega A.L., Rodnina M.V. A kinetic safety gate controlling the delivery of unnatural amino acids to the ribosome // *J Am Chem Soc*. 2013. Vol. 135, № 45. P. 17031–17038.
 46. Di Giambattista M., Chinali G., Cocito C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes // *J Antimicrob Chemother*. 1989. Vol. 24, № 4. P. 485–507.
 47. Gromadski K.B., Rodnina M.V. Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome // *Mol Cell*. 2004. Vol. 13, № 2. P. 191–200.
 48. Johansson M. et al. The kinetics of ribosomal peptidyl transfer revisited // *Mol Cell*. 2008. Vol. 30, № 5. P. 589–598.

Аспирант _____ Шуленина Ольга Владиславовна