СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 11, 2020

Специальный выпуск «Преодоление резистентности микроорганизмов к антибиотикам путём создания новых антибактериальных препаратов»
Посвящен юбилею академика А.А. Богданова

От редакции 1515

Молекулярные механизмы преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам
А.Г. Габибов, О.А. Донцова, А.М. Егоров 1516

Ингибиторы β-лактамаз. Новая жизнь β-лактамных антибиотиков (обзор)
А.М. Егоров, М.М. Уляшова, М.Ю. Рубцова 1519

Ингибирование хламидийной инфекции путем CRISPR/Cas9-SAM опосредованного усиления экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков человека в клетках линии HeLa
П.А. Бобровский, В.Д. Мороз, В.Н. Лавренова, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев 1540

Использование расширенного химического пространства лантибиотиков для создания искусственного биоразнообразия генетически кодируемых антибиотиков (обзор)
С.О. Пипия, С.С. Терехов, Ю.А. Мокрушина, В.Д. Кнорре, И.В. Смирнов, А.Г. Габибов 1550

Метилирование рРНК и устойчивость к антибиотикам (обзор)
И.А. Остерман, О.А. Донцова, П.В. Сергиев 1569

Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине (обзор)
В.В. Власов, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова 1587

Антибиотики из морских бактерий (обзор)
В.А. Стоник, Т.Н. Макарьева, Л.К. Шубина 1601

Новые возможности в борьбе с патогенными микроорганизмами (обзор)
И.Г. Шемякин, В.В. Фирстова, Н.К. Фурсова, И.В. Абаев, С.Ю. Филиппович, С.Г. Игнатов, И.А. Дятлов 1615

Краткий справочник по низкомолекулярным ингибиторам эукариотической трансляции (обзор)
С.Е. Дмитриев, Д.О. Владимиров, К.А. Лашкевич 1633

Особенности активации гидролитической активности факторов элонгации (обзор)
Е.В. Полесскова, М.Ю. Каюмов, С.В. Кириллов, А.Л. Коневега 1676

Гибернация – стадия функционирования рибосом (обзор)
К.С. Усачев, М.М. Юсупов, Ш.З. Валидов 1690

Взаимодействие катионных пептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомой
З.З. Хайруллина, А.Г. Терещенков, С.А. Завьялова, Е.С. Комарова, Д.А. Лукьянов, В.Н. Ташлицкий, И.А. Остерман, Н.В. Сумбатян 1701

Исследование аллостерического эффекта 2,8-диметилирования A2503 23S рРНК *E. coli* методом молекулярно-динамического моделирования
Т.М. Макарова, Г.И. Макаров 1718

CONTENTS

Vol. 85, Publ. 11, 2020

Overcoming Microbial Resistance to Antibiotics by Creating Novel Antimicrobial Preparations (Special Issue) Dedicated to the Anniversary of Academician A. A. Bogdanov

Editorial 1515

Overcoming Antibiotic Resistance in Microorganisms: Molecular Mechanisms
A. G. Gabibov, O. A. Dontsova, and A. M. Egorov 1516

Inhibitors of β-Lactamases. New Life of β-Lactam Antibiotics (Review)
A. M. Egorov, M. M. Ulyashova, and M. Yu. Rubtsova 1519

Inhibition of Chlamydial Infection by CRISPR/Cas9-SAM Mediated Enhancement of Human Peptidoglycan Recognition Proteins Gene Expression in HeLa Cells
P. A. Bobrovsky, V. D. Moroz, V. N. Lavrenova, V. A. Manuvera, and V. N. Lazarev 1540

Engineering Artificial Biodiversity of Lantibiotics to Expand the Chemical Space of DNA-Encoded Antibiotics (Review)
S. O. Pipiya, S. S. Terekhov, Yu. A. Mokrushina, V. D. Knorre, I. V. Smirnov, and A. G. Gabibov 1550

rRNA Methylation and Antibiotic Resistance (Review)
I. A. Osterman, O. A. Dontsova, and P. V. Sergiev 1569

Bacteriophages as Therapeutic Preparations: What Restricts Their Application in Medicine (Review)
V. V. Vlassov, N. V. Tikunova, and V. V. Morozova 1587

Antibiotics from Marine Bacteria (Review)
V. A. Stonik, T. N. Makarieva, and L. K. Shubina 1601

New-Generation Antibiotics, Bacteriophage Endolysins and Nanomaterials for Combating Pathogens (Review)
I. G. Shemyakin, V. V. Firstova, N. K. Fursova, I. V. Abaev, S. Yu. Filippovich, S. G. Ignatov, and I. A. Dyatlov 1615

A Quick Guide to Small-Molecule Inhibitors of Eukaryotic Protein Synthesis (Review)
S. E. Dmitriev, D. O. Vladimirov, and K. A. Lashkevich 1633

Peculiarities in Activation of Hydrolytic Activity of Elongation Factors (Review)
E. V. Paleskava, M. Y. Kaiumov, S. V. Kirillov, and A. L. Konevega 1676

Hibernation as a Stage of Ribosome Functioning (Review)
K. S. Usachev, M. M. Yusupov, and Sh. Z. Validov 1690

Interaction of Chloramphenicol Cationic Peptide Analogues with the Ribosome
Z. Z. Khairullina, A. G. Tereshchenkov, S. A. Zavyalova, E. S. Komarova, D. A. Lukianov, V. N. Tashlitsky, I. A. Osterman, and N. V. Sumbatyan 1701

Investigation of Allosteric Effect of 2,8-Dimethylation of A2503 23S rRNA in *E. coli* by Molecular-Dynamics Simulation
T. M. Makarova and G. I. Makarov 1718

Дорогие читатели журнала «Биохимия»!

Этот выпуск посвящён выдающемуся биохимику и молекулярному биологу академику Алексею Алексеевичу Богданову, чья жизнь всецело посвящена исследованию нуклеопротеидного взаимодействия и одной из важнейших молекулярных машин клетки – рибосоме. Достижения Алексея Алексеевича в исследованиях рибосом и синтеза белка имеют приоритетный характер. А.А. Богданов открыл явление разворачивания рибосом и совместно с А.С. Спириным показал принципиальную возможность их самосборки. В последние годы Алексея Алексеевича увлекли структурные аспекты взаимодействия рибосом с антибиотиками. Им совместно с учениками обнаружены новые антибиотические вещества, специфически узнающие сайты рибосомы и регулирующие синтез белка. В этой связи редколлегия журнала «Биохимия» приняла решение посвятить специальный номер, выходящий к 85-летию Алексея Алексеевича Богданова, проблемам структуры и механизма действия рибосом, а также их взаимодействия с антибиотиками. Особое внимание было уделено резистентности бактерий к антибиотикам. Мы желаем Алексею Алексеевичу долгих лет жизни и успехов в научном творчестве.

Редакционная коллегия журнала «Биохимия»

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1516 – 1518

УДК 577.182

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

© 2020 А.Г. Габибов[1,2], О.А. Донцова[1,2,3], А.М. Егоров[2]*

[1] *Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: alex.m.egorov@gmail.com*

[3] *Сколковский институт науки и технологии, Центр наук о жизни, 143028 Сколково, Россия*

Поступила в редакцию 12.10.2020
После доработки 12.10.2020
Принята к публикации 12.10.2020

В обзорных и экспериментальных статьях этого выпуска журнала «Биохимия» представлены новые направления решения проблемы резистентности и исследования, связанные с поиском новых антимикробных препаратов с использованием методов молекулярной биологии, генетики и нанотехнологий. Большое разнообразие научных подходов, отражающих, как правило, положительные результаты исследований, вселяют надежду на успешное преодоление резистентности микроорганизмов к антибиотикам в борьбе с инфекционными заболеваниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антимикробные препараты, резистентность, рекомбинантные технологии, новые ингибиторы.

DOI: 10.31857/S0320972520110019

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение устойчивой резистентности микроорганизмов к антибиотикам является одним из глобальных вызовов XXI века [1]. Преодоление резистентности для эффективной борьбы с инфекционными заболеваниями привлекает к себе внимание специалистов разных областей науки. Резистентность связана с фундаментальными проблемами молекулярной биологии микроорганизмов. Биохимические процессы, отвечающие за резистентность к различным антибиотикам, возникли более 2 млрд лет назад и постоянно эволюционировали. В основе их развития находится межвидовая конкуренция, в результате чего микроорганизмы производят сотни различных классов антибиотиков и вырабатывают большое количество защитных механизмов [2]. Мишенями антибиотиков являются различные структуры, начиная от компонентов клеточной стенки, пептидогликана цитоплазматической мембраны, ферментов генетического аппарата, рибосомы, синтеза белка, метаболических процессов. Комплекс генов, ответственных за синтез механизмов резистентности, получил название «резистом», а комплекс ферментов, участвующих в процессах резистентности, – «энзистом» [3, 4]. Ферменты выполняют разные функции: являются мишенями антибактериальных препаратов, модифицируют их структуру, изменяют клеточные генетические мишени антибиотиков. Антибиотики, влияющие на синтез белка и структуру рибосом, являются одной из широко используемых групп антимикробных препаратов, однако резистентность к ним обусловлена ферментативной модификацией рибосом [5, 6].

Для преодоления резистентности рассматриваются подходы, которые включают создание различных антимикробных препаратов, новые бактериальные мишени, регуляцию генома, фаги, антимикробные пептиды и белки. Поиск новых препаратов опирается на использование методов молекулярной биологии, генетики, нанотехнологий. Импульс к поиску новых антимикробных препаратов связан с детальным изучением микробиома человека и животных, а также с новыми исследованиями биоресурсов почвы и водоёмов [7].

В обзорных и экспериментальных статьях данного номера журнала «Биохимия» нашли отражение все перечисленные направления исследований.

* Адресат для корреспонденции.

ПРЕОДОЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Ингибиторы β-лактамаз. Учитывая роль β-лактамных антибиотиков, широко используемых в настоящее время, одной из важнейших задач является сохранение их потенциала. Механизм резистентности β-лактамных антибиотиков обусловлен гидролизом лактамного кольца ферментами β-лактамазами. Ингибиторы этих ферментов, применяемые совместно с антибиотиками, позволяют сохранить антимикробную активность β-лактамов. В обзоре Егорова с соавт. [8] подробно рассмотрена структура и механизм действия ингибиторов различных поколений и перспективы их применения.

Пептидогликан-распознающие белки. Многие другие классы антимикробных препаратов направлены против мишеней клеточных мембран. К ним относятся пептидогликан-распознающие белки, рассмотренные в обзоре Бобровского с соавт. [9]. Эти белки относятся к компонентам врождённого иммунитета и связываются с пептидогликаном бактерий. Авторы предлагают оригинальную технологию редактирования генома клеток человека, повышающую экспрессию генов, кодирующих пептидогликан-распознающие белки.

Пептидные антибиотики лантипептидов. Группа пептидных антибиотиков лантипептидов рассмотрена в обзоре Габибова с соавт. [10]. До последнего времени использование пептидных антибиотиков, кроме ванкомицина, имело ограниченное применение из-за низкой специфичности и нестабильности, а также в связи со сложностью их производства. В обзоре предлагается новый подход к получению большого разнообразия пептидных антибиотиков с изменённой генетически кодируемой первичной структурой. Для скрининга пептидов с антимикробной активностью авторы предлагают применять технологию микрофлюидики, позволяющую тестировать биологическую активность.

Метилирование и антибиотики. Одной из широко распространённых мишеней микроорганизмов для антибиотиков являются функциональные центры рибосом. Механизмом резистентности к макролидам и другим антибиотикам является метилирование нуклеотидных остатков метилтрансферазами. В обзоре Донцовой с соавт. [11] подробно рассмотрены механизмы метилирования нуклеотидных остатков, находящихся в различных центрах рибосом, определяющих резистентность к разным группам антибиотиков. В обзоре подробно обсуждаются генетические механизмы, ответственные за синтез метилтрансфераз, и их роль в эволюции резистентности.

Бактериофаги являются одним из старых-новых направлений развития подходов в борьбе с мультирезистентными бактериями. Являясь антибактериальными вирусами, фаги представляют генетический механизм преодоления резистентности. В отличие от антибиотиков, имеющих, как правило, широкий спектр действия, фаги обнаруживают узкую специфичность к различным возбудителям, что влияет на их промышленное производство и применение. В настоящее время методы генетической инженерии позволяют изменять свойства фагов, расширяя области их применения. Этим вопросам посвящён аналитический обзор Власова с соавт. [12], в котором в полемической форме обсуждается использование фагов в медицине.

Морские бактерии являются новым источником антибактериальных препаратов, из экстрактов которых выделены антимикробные метаболиты, разнообразные по своему строению, часто не имеющие аналогов. Их изучению посвящён обзор Стоника с соавт. [13] «Антибиотики из морских бактерий». Как правило, эти препараты находятся на разных этапах доклинических и клинических исследований.

Антибиотики нового поколения. Статья Шемякина с соавт. [14] посвящена рассмотрению различных подходов к решению проблемы борьбы с резистентностью бактерий. Рассмотрены методы, основанные на использовании малых некодирующих РНК (sRNA) или CRISPR-Cas систем, играющих важную роль в регуляции генетических процессов бактерий. В настоящее время методы находятся в стадии экспериментальной разработки и представляются важными для научных исследований. Большое внимание в обзоре уделено ингибированию различных клеточных процессов, к которым относятся ингибирование β-лактамаз, эффлюксных насосов, трансмембранного переноса, биоплёнок, процессов вирулентности, механизмов межклеточных коммуникаций. Часть из этих ингибиторов нашла практическое применение в медицине, многие остаются предметом научных исследований. Важно отметить, что многие ингибиторы являются пептидами, что открывает новые возможности для создания антимикробных препаратов. Другое направление действия пептидов связано со стимуляцией врождённых иммунных реакций для разработки противомикробных препаратов. Ещё одним подходом для разрушения резистентности являются фаговые препараты эндолизины, разрушающие клеточные стенки бактерий и биоплёнки. В настоящее время рекомбинантные эндолизины проходят клинические испытания.

Остро стоит вопрос о создании биосовместимых поверхностей трансплантируемых органов.

В обзоре рассмотрены различные подходы к созданию наноматериалов с антибактериальными свойствами.

В заключение стоит отметить, что представленные в номере обзоры и экспериментальные работы показывают основные направления развития методов преодоления резистентности и создания новых антибактериальных препаратов. Эти работы основаны на глубоком изучении механизмов генетических и ферментативных процессов, ответственных за резистентность. Создание принципиально новых инновационных антибактериальных препаратов базируется на современных достижениях различных отраслей биологической науки. Хотя многие подходы, представленные в номере, находятся в состоянии научных исследований, полученные экспериментальные результаты открывают новые горизонты для создания эффективных препаратов, столь необходимых в борьбе с возбудителями инфекционных болезней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019.
2. Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Malakhova, M. V., Samoilov, A. E., Manolov, A. I., et al. (2018) Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9551-9556.
3. Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., and Rubtsova, M. Y. (2018) Bacterial enzymes and antibiotic resistance, *Acta Naturae*, **10**, 33-48.
4. Terekhov, S. S., Mokrushina, Y. A., Nazarov, A. S., Zlobin, A., Zalevsky, A., et al. (2020) A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding, *Sci. Adv.*, **6**, eaaz9861.
5. Tereshchenkov, A. G., Dobosz-Bartoszek, M., Osterman, I. A., Marks, J., Sergeeva, V. A., et al. (2018) Binding and action of amino-acid analogues of chloramphenicol upon the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **430**, 842-852, doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.016.
6. Osterman, I. A., Wieland, M., Maviza, T. P., Lashkevich, K. A., Lukianov, D. A., et al. (2020) Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 1071-1077.
7. Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Stepanova, A. V., Bobik, T. V., Mokrushina, Y. A., et al. (2017) Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2550-2555.
8. Егоров А. М., Уляшова М. М., Рубцова М. Ю. (2020) Ингибиторы β-лактамаз. Новая жизнь β-лактамных антибиотиков, *Биохимия*, **85**, 1519-1539, doi: 10.31857/S0320972520110020.
9. Бобровский П. А., Мороз В. Д., Лавренов В. Н., Манувера В. А., Лазарев В. Н. (2020) Ингибирование хламидийной инфекции путем CRISPR/CAS9-SAM опосредованного усиления экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков человека в клетках линии HELA, *Биохимия*, **85**, 1540-1549, doi: 10.31857/S0320972520110032.
10. Пипия С. О., Терехов С. С., Мокрушина Ю. А., Кнорре В. Д., Смирнов И. В., Габибов Г. А. (2020) Использование расширенного химического пространства лантибиотиков для создания искусственного биоразнообразия генетически кодируемых антибиотиков, *Биохимия*, **85**, 1550-1568, doi: 10.31857/S0320972520110044.
11. Остерман И. А., Донцова О. А., Сергиев П. В. (2020) Метилирование рРНК и устойчивость к антибиотикам, *Биохимия*, **85**, 1569-1586, doi: 10.31857/S0320972520110056.
12 Власов В. В., Тикунова Н. В., Морозова В. В. (2020) Бакториофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине, *Биохимия*, **85**, 1587-1600, doi: 10.31857/S0320972520110068.
13. Стоник В. А., Макарьева Т. Н., Шубина Л. К. (2020) Антибиотики из морских бактерий, *Биохимия*, **85**, 1601-1614, doi: 10.31857/S032097252011007X.
14. Шемякин И. Г., Фирстова В. В., Фурсова Н. К., Абаев И. В., Филиппович С. Ю., Игнатов С. Г., Дятлов И. А. (2020) Новые возможности в борьбе с патогенными микроорганизмами, *Биохимия*, **85**, 1615-1632, doi: 10.31857/S0320972520110081.

OVERCOMING ANTIBIOTIC RESISTANCE IN MICROORGANISMS: MOLECULAR MECHANISMS

A. G. Gabibov[1,2], O. A. Dontsova[1,2,3], and A. M. Egorov[2]*

[1] *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

[2] *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: alex.m.egorov@gmail.com*

[3] *Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Skolkovo, Russia*

Received October 12, 2020
Revised October 12, 2020
Accepted October 12, 2020

This issue of the Biochemistry (Moscow) journal presents reviews and experimental articles on the new strategies for solving the problem of antibiotic resistance and on the search for novel antimicrobial preparations using the methods of molecular biology, genetics, and nanotechnology. A wide variety of scientific approaches and successful (as a rule) research results give hope for overcoming microbial antibiotic resistance in the fight against infectious diseases.

Keywords: antimicrobial drugs, resistance, recombinant technologies, new inhibitors

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1519 – 1539

УДК 577.151;577.181.5

ИНГИБИТОРЫ β-ЛАКТАМАЗ. НОВАЯ ЖИЗНЬ β-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Обзор

© 2020 А.М. Егоров, М.М. Уляшова, М.Ю. Рубцова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 09.07.2020
После доработки 14.08.2020
Принята к публикации 15.08.2020

β-Лактамные антибиотики составляют около 60% от всех выпускаемых антибиотиков и благодаря своей высокой активности и минимальным побочным эффектам широко используются для лечения различных инфекционных заболеваний человека и животных, включающих тяжелые госпитальные инфекции. Однако глобальное распространение бактерий, резистентных к β-лактамам, привело к их клинической неэффективности. Поиск эффективных способов преодоления устойчивости бактерий к β-лактамным антибиотикам, преимущественным механизмом которой является синтез разнообразных β-лактамаз, разрушающих β-лактамное кольцо антибиотиков, является важнейшей задачей. Данный обзор посвящен анализу специфических ингибиторов сериновых и металло-β-лактамаз и подходов к созданию новых ингибиторов, которые позволят продлить «жизнь» β-лактамов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антибиотикорезистентность бактерий, β-лактамазы, ингибиторы, β-лактамные антибиотики.

DOI: 10.31857/S0320972520110020

ЭРА АНТИБИОТИКОВ И РОЛЬ β-ЛАКТАМОВ

Инфекционные заболевания на протяжении многих веков оставались постоянной угрозой здравоохранению, до начала 1900-х гг. на их долю приходилось до 25% смертности [1]. Открытие в 1929 г. британским микробиологом А. Флемингом антимикробных свойств плесени *Penicillium notatum* завершилось созданием первого β-лактамного антибиотика – пенициллина и ознаменовало появление нового класса лекарственных средств.

β-Лактамные антибиотики, продуцируемые различными бактериями и грибами, существуют в природе более 2 млрд лет. Мишенью их действия являются пенициллин-связывающие белки (ПСБ), катализирующие различные реакции синтеза пептидогликана, – основного элемента клеточной стенки бактерий [2]. Антибактериальная активность основана на структурном сходстве β-лактамного кольца антибиотика с концевым D-Ala-D-Ala-фрагментом пентапептидов, входящих в состав пептидогликана. β-Лактамы образуют ковалентный комплекс с серином транспептидазного домена ПСБ и, таким образом, являются необратимыми ингибиторами синтеза пептидогликана, вызывая лизис клеток бактерий и потерю ими жизнеспособности.

Высокая эффективность действия пенициллина и его природных аналогов, относительно низкие токсичность и стоимость промышленного синтеза послужили толчком к созданию новых β-лактамных антибиотиков [3]. Целью химической модификации β-лактамов являлось расширение спектра действия, улучшение фармакокинетических свойств, а также противодействие механизмам резистентности. В настоящее время к этому классу относятся четыре группы соединений, содержащих четырехчленное β-лактамное кольцо: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы (рис. 1).

Открытие пенициллина явилось одним из наиболее значимых открытий XX века. Успехи в химической модификации пенициллинов, цефалоспоринов и карбапенемов позволили соз-

Принятые сокращения: АМА – аспергилломаразмин А; БЛ – β-лактамазы; БЛРС – β-лактамазы расширенного спектра; ДБО – диазабициклооктан; МБЛ – металло-β-лактамазы; ПСБ – пенициллин-связывающие белки.

* Адресат для корреспонденции.

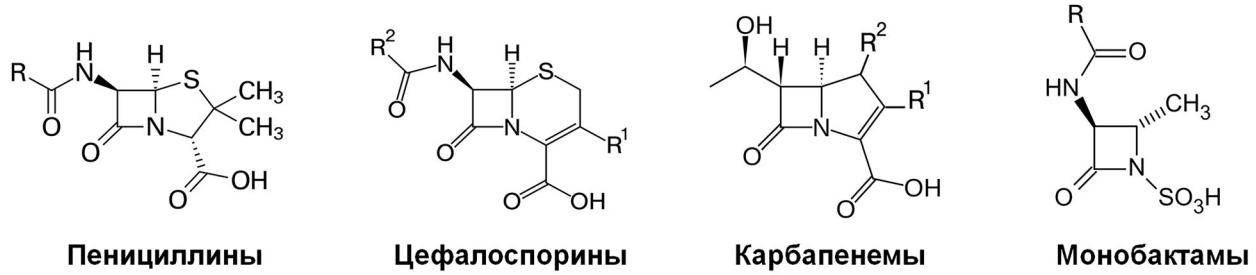


Рис. 1. Структуры основных групп β-лактамных антибиотиков

дать несколько десятков лекарственных препаратов для подавления огромного количества бактериальных инфекций, включая их тяжелые внутрибольничные формы. Отсутствие в организме человека мишени действия β-лактамов обуславливает низкую токсичность этого класса антибиотиков. Благодаря своим свойствам β-лактамные антибиотики уже более 70 лет после начала их клинического применения остаются наиболее часто используемыми антибактериальными препаратами. Они составляют около 60% от всех антибиотиков, применяемых в медицине и сельском хозяйстве для лечения и профилактики инфекционных заболеваний человека и животных [4]. Некоторые антибиотики этого класса относятся к так называемой «группе резерва».

Основным фактором, ограничивающим клиническую эффективность β-лактамных антибиотиков, является эволюция микроорганизмов, приводящая к развитию резистентности. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), устойчивость к антимикробным препаратам была названа в 2019 г. одной из десяти основных угроз здоровью населения во всем мире [5]. В результате «жизненный цикл» в практической медицине многих β-лактамов оказался ограниченным, а создание новых соединений этого класса антибактериальных препаратов фатально сократилось.

«ТРАГЕДИЯ» β-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ, β-ЛАКТАМАЗЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Практически одновременно с открытием пенициллина появились первые сообщения о выделении штаммов микроорганизмов, обладающих природной резистентностью к этому антибиотику. Это явление представляет собой защитный механизм бактерий, созданный в процессе их эволюционного развития и конкурентной борьбы с другими микроорганизмами. Селективное давление антибиотиков на микроорганизмы в результате интенсивного использования в клинической медицине, и особенно в ветеринарии и сельском хозяйстве, часто неконтролируемое, привело к развитию различных механизмов устойчивости, к которым относятся эффлюкс (вывод антибиотика из клетки), модификация поринов – мембранных транспортных белков, модификация структуры антибиотика или мишени его действия [6].

Бактериальные ферменты участвуют в реализации всех механизмов резистентности микроорганизмов к антибиотикам [7]. Наиболее распространенным механизмом устойчивости к β-лактамам является экспрессия специфических гидролаз – β-лактамаз (БЛ, EC 3.5.2.6), которые катализируют гидролиз β-лактамного кольца антибиотика. Одним из первых был описан гидролиз пенициллинов у грамположительных бактерий. Позднее у этих бактерий основным стал механизм устойчивости, обусловленный приобретением новых генов, например *mecA* у метициллин-резистентного стафилококка (MRSA), которые кодируют дополнительные ПСБ с пониженным сродством к β-лактамам [8]. У грамотрицательных бактерий наиболее распространенным механизмом устойчивости остается синтез БЛ, они образуют суперсемейство ферментов из ~2800 представителей [9]. Постоянно обновляемая информация о БЛ размещается на сайте National Center for Biotechnology Information (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources).

Общим свойством этих ферментов является катализ гидролиза амидной связи β-лактамного кольца – главного структурного элемента, обеспечивающего антибактериальную активность. Особенностью БЛ является высокая скорость мутирования. Кодирующие БЛ гены, как правило, локализованы на мобильных генетических элементах (плазмидах, транспозонах и интегронах), что способствует их быстрому распространению среди бактерий, вызывающих инфекци-

онные заболевания, а также находящихся в окружающей среде (воде, почве) [10]. Сочетание в бактериальных клетках генов различных БЛ вместе с другими генами устойчивости приводит к появлению «множественной лекарственной резистентности» (MDR), «экстремальной лекарственной резистентности» (XDR) и «панрезистентности» (PDR) [11]. В результате многие возбудители инфекций становятся смертельно опасными и представляют глобальную угрозу.

БЛ имеют общий с ПСБ белок-предшественник, поэтому оба семейства характеризуются общими структурными элементами. ПСБ и сериновые БЛ образуют ковалентный комплекс серина активного центра с молекулой антибиотика (ацил-фермент), при этом происходит разрыв амидной связи в β-лактамном кольце. Образование комплекса антибиотика с ПСБ является необратимым, что приводит к его ингибированию.

На основании гомологии первичных последовательностей выделяют четыре молекулярных класса БЛ: A, B, C и D. Ферменты классов A, C и D являются сериновыми гидролазами, представители класса B являются металло-ферментами и содержат в активном центре один или два иона Zn^{2+} в качестве кофактора. БЛ каждого класса делятся на типы ферментов, различающихся по субстратной специфичности и чувствительности к действию различных ингибиторов. У устойчивых к β-лактамам бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний человека – наиболее распространенными являются БЛ класса A, относящиеся в первую очередь к типам TEM, CTX-M и SHV; в последние годы отмечается экспоненциальный рост карбапенемаз классов B, D и A [9].

Все сериновые БЛ имеют компактную белковую глобулу, образованную одной полипептидной цепью, вторичная структура которой включает 11 α-спиралей, 5 β-листов и петли нерегулярной структуры (рис. 2, *а*). Структура сериновых БЛ относится к типу сэндвич и состоит из трех α/β/α доменов, соединенных сетью ионных и водородных связей [12]. Сериновые БЛ имеют компактное ядро-скэффолд, состоящее из сближенных в пространстве α-спирали и β-листа, включающих консервативные участки из 3–4 аминокислот, в том числе каталитический серин. Хотя в целом структура белковой глобулы является достаточно жесткой, ее гибкость обусловлена движением петель, в которых чаще всего происходят мутации [13, 14]. Важным консервативным структурным элементом является Ω-петля, расположенная в нижней части входа в карман активного центра и содержащая каталитически важный консервативный остаток Glu (рис. 2, *б*). Данный остаток играет ключевую роль в процессе деацилирования ацил-ферментного комплекса, в результате чего разрушенная молекула антибиотика выводится из активного центра БЛ [15].

Механизм гидролиза β-лактамов сериновыми БЛ разных классов достаточно общий и

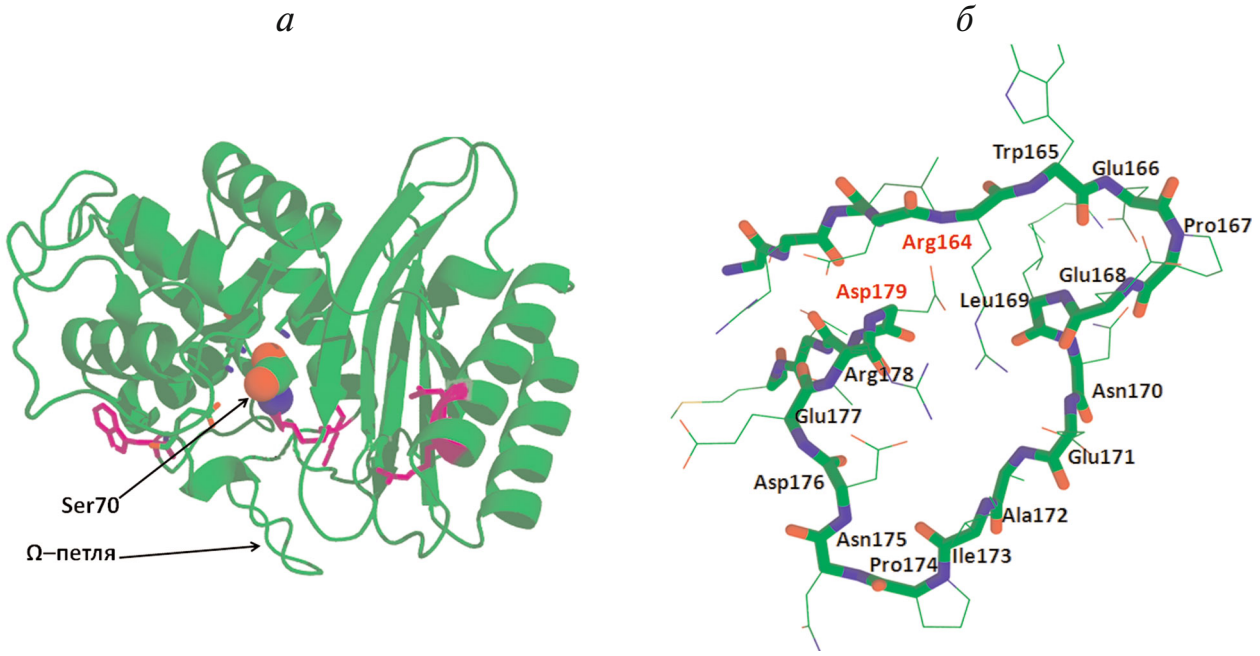


Рис. 2. *а* – Структура β-лактамазы TEM-1 класса A, каталитический Ser70 представлен в виде шара, *б* – структура Ω-петли β-лактамаз TEM-типа

включает три основные стадии (рис. 3, *а*). Общим для всех ферментов является образование ковалентного ацил-ферментного комплекса с остатком серина, в стабилизации которого принимают участие различные а.о. в зависимости от структуры активного центра. На первом этапе происходит ориентация и связывание молекулы антибиотика в активном центре фермента и активация гидроксильной группы каталитического серина. Для БЛ ТЕМ-типа класса А установлено, что для активации серина необходимо депротонирование остатка Lys73. Этот путь депротонирования включает образование цепочки водородных связей с участием остатков Glu166 и Asn170 Ω-петли и молекулы воды (рис. 3, *б*) [16]. Альтернативный путь депротонирования остатка Lys73 происходит с участием Ser130, расположенного на SDN-петле (остатки Ser130-Asn132). Далее гидроксильная группа серина действует как нуклеофил и атакует карбонильную группу β-лактамного кольца антибиотика с образованием высокореакционного тетраэдрического ацилированного интермедиата, превращающегося в низкоэнергетический ацил-ферментный комплекс, в котором серин активного центра ковалентно связан с молекулой антибиотика. На третьей стадии молекула воды, координированная в активном центре фермента с участием остатка Glu166 и других заряженных остатков Ω-петли, атакует ковалентный ацил-ферментный комплекс. В результате деацилирования амидной связи β-лактамное кольцо молекулы антибиотика разрушается, он выходит из активного центра, и молекула фермента высвобождается для следующего каталитического акта [17].

Причиной модификации структуры β-лактамаз являются мутации в кодирующих генах, которые затрагивают как аминокислоты активного центра БЛ, так и периферийные области белковой глобулы. Некоторые мутации, называемые ключевыми, приводят к изменениям структурных элементов, образующих активный центр. В результате у мутантных ферментов изменяются каталитическая активность и субстратная специфичность. Например, мутации остатков Ω-петли (Arg164, расположенного на *N*-конце петли у БЛ ТЕМ-типа, и Asp179, расположенного на *C*-конце петли у БЛ SHV-типа) приводят к изменению конформации петли и увеличению объема активного центра, в результате образуются стабильные комплексы фермента с оксиимино-цефалоспоринами, имеющими объемные боковые группы [18]. Таким образом появились БЛ расширенного спектра (БЛРС), которые эффективно гидролизуют цефалоспорины II–IV поколений [9]. Другим направлением эволюции БЛ является появление новых типов ферментов с расширенной субстратной специфичностью, например карбапенемаз KPC-типа класса А и OXA-типа класса D.

Наиболее распространенными в настоящее время являются сериновые БЛ класса А, относящиеся к типам ТЕМ, SHV, CTX-M и KPC. Каждый тип представляет собой большое семейство от нескольких десятков до нескольких сотен ферментов, имеющих родоначальника, например ТЕМ-1 или SHV-1. Остальные ферменты каждого типа представляют собой мутантные формы, содержащие от одной до нескольких аминокислотных замен. Ферменты типов ТЕМ и SHV разделяются на БЛ широкого спектра, гидролизующие только пенициллины и цефалоспорины I поколения, и БЛРС с мутациями ключевых остатков, гидролизующие пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений. Особенностью БЛ SHV-типа является наличие вставок в аминокислотную последовательность, в частности у БЛ SHV-16 имеется повтор участка Ω-петли от остатка Asp163 до остатка Thr168, включающего каталитически важный остаток Glu166 [19]. Этот фермент характеризуется увеличенной конформационной подвижностью каталитических участков, что улучшает доступ в активный центр цефалоспоринов III поколения, но при этом термостабильность фермента понижается. По-видимому, это связано с перераспределением внутренних контактов между а.о. петли и их контактов с другими а.о. белковой глобулы, которые изменяют стабильность белковой глобулы [20].

Субстратами БЛ типа CTX-M являются цефалоспорины III–IV поколений. Все ферменты этого типа являются БЛРС, и их распространение среди клинических возбудителей приняло глобальный характер [21]. На основании гомологии первичных последовательностей БЛ этого типа разделяются на пять субкластеров, они характеризуются более низкой гомологией по сравнению с ферментами типов ТЕМ и SHV [22]. Различия в субстратной специфичности ферментов типа CTX-M состоят в изменениях каталитической активности в отношении различных цефалоспоринов III поколения (цефотаксима, цефтазидима и цефепима). Особенностью данных ферментов является появление гибридных ферментов, имеющих фрагменты структуры БЛ из разных субкластеров, например БЛ CTX-M-116, -123 и -132 являются гибридами БЛ CTX-M-15 и CTX-M-14 [23–25]. Ключевые замены у этих ферментов способствуют улучшению эффективности гидролиза цефтазидима, наиболее распространенными из них являются Asp240Gly и замена в Ω-петле Pro167Ser/Thr.

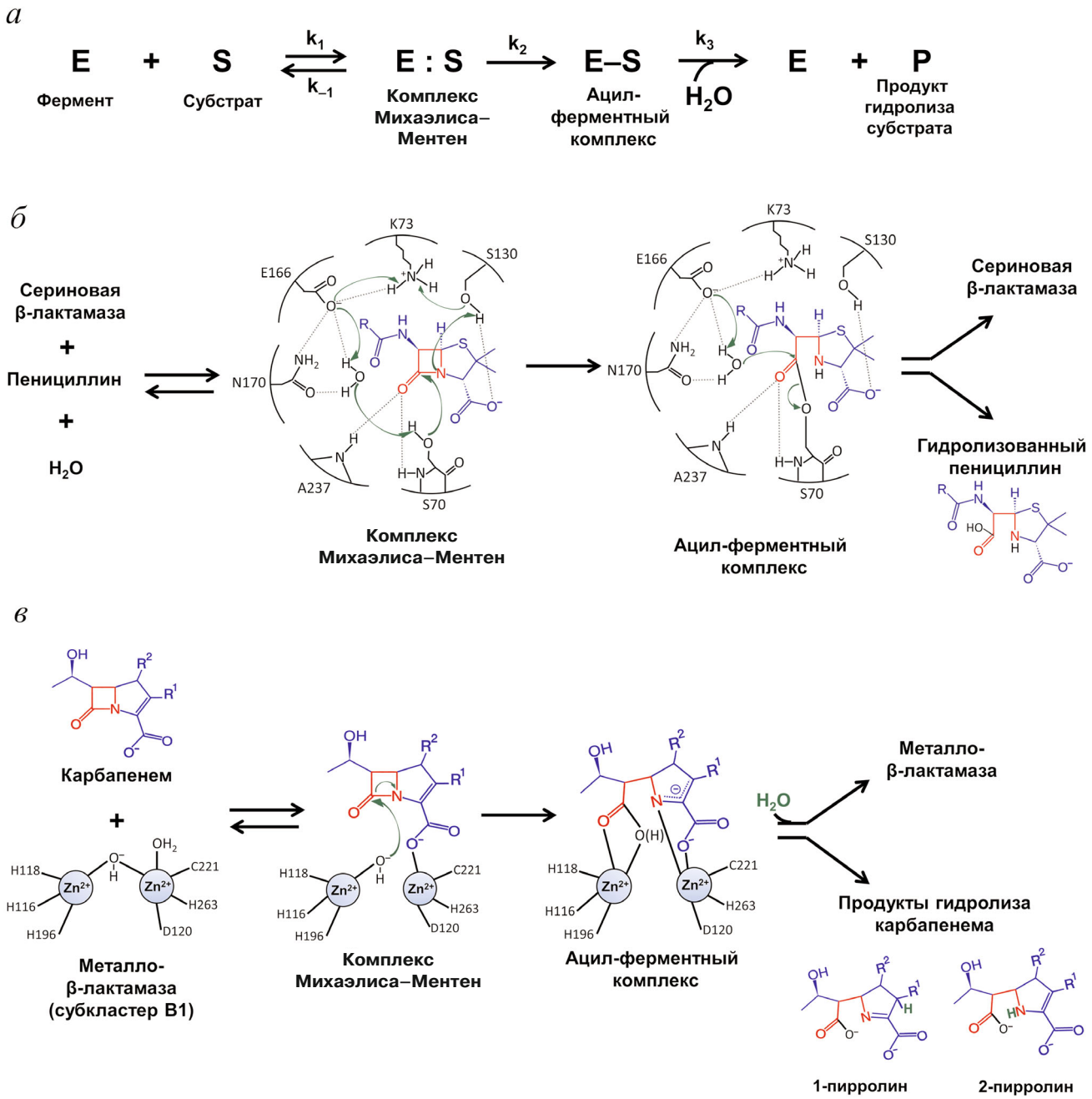


Рис. 3. *а* – Общая схема гидролиза β-лактамных антибиотиков β-лактамазами, *б* – механизм гидролиза пенициллина β-лактамазами класса А, *в* – механизм гидролиза карбапенемов металло-β-лактамазами

У БЛ класса С каталитическим является Ser64, в роли общего основания выступает Tyr150, важную роль в правильной фиксации молекулы субстрата играет остаток Asn152 (аналог Asn132 у БЛ класса А). У БЛ класса D каталитическим является Ser67, однако механизм его активации для последующей нуклеофильной атаки β-лактамного кольца остаётся неясным. По-видимому, роль общего основания у этих ферментов выполняет остаток Lys70, который занимает оптимальное положение в структуре фермента для активации молекулы воды, аналогичное Lys73 у ферментов класса А.

Молекулярный класс B объединяет большое семейство металло-БЛ (МБЛ), содержащих в качестве кофактора один или два иона Zn^{2+} и гидролизующих три группы β-лактамов (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы) (рис. 3, *в*) [16, 17]. Эволюционно они отделились от предшественников ПСБ раньше других БЛ и яв-

ляются членами огромного суперсемейства металло-гидролаз. На основании гомологии первичной структуры, субстратного профиля и количества ионов Zn^{2+} МБЛ делятся на три субкластера: B1, B2 и B3. Ферменты субкластеров B1 и B3 являются бицинковыми, субкластера B2 – моноцинковыми. Особенностью МБЛ является низкая степень гомологии (не более 20% внутри субкластеров), даже остатки, участвующие в координации ионов металла, не являются консервативными у ферментов разных субкластеров. К наиболее клинически значимым типам МБЛ относятся ферменты субкластера B1: VIM, IMP, и NDM.

Активный центр МБЛ располагается на дне широкой неглубокой впадины между двумя β-листами. У ферментов субкластера B1 ион Zn^{2+} в первом Zn-связывающем центре имеет тетраэдрическое окружение с участием остатков His116, His118, His196, во втором – является пента-координированным с участием остатков His263, Cys221 и Asp120 (рис. 3, *в*) [16, 26]. В координации ионов Zn^{2+} принимают участие две молекулы воды, одна из которых (соединительная) соединяет два иона металла, другая (апикальная) связана со вторым ионом Zn^{2+}. Ионы металла субкластера B3 сохраняют координацию с теми же остатками в первом центре связывания, во втором – цистеин заменен на гистидин. Отличительной особенностью МБЛ субкластеров B1 и B3 является подвижная L3-петля, расположенная у входа в активный центр между α3-спиралью и β7-листом. Конформация петли изменяется при связывании субстрата, что приводит к изменениям эффективных значений диэлектрической проницаемости и стабилизирует промежуточные формы фермент-субстратных комплексов [26, 27].

При связывании антибиотика бицинковыми МБЛ происходит координация второго иона Zn^{2+} с карбоксильной группой субстрата, высвобождая гидроксид-ион (рис. 3, *в*) [16]. Ион металла оттягивает электронную плотность с карбонильного атома кислорода, повышая и стабилизируя положительный заряд на нем. Координированный с ионом Zn^{2+} гидроксид-ион является лучшим нуклеофилом, чем молекула воды, он атакует карбонильный атом углерода молекулы антибиотика. Образуется промежуточный продукт с отрицательным зарядом, делокализованным в пирролидиновом кольце. Далее происходит протонирование с участием молекулы воды, либо атома C2 с образованием 1-пирролина, либо атома N4 с образованием 2-пирролина.

Моноцинковые МБЛ субкластера B2 являются исключительно карбапенемазами: они эффективно гидролизуют только карбапенемы и проявляют низкую активность в отношении пенициллинов и цефаллоспоринов. Это может быть связано с тем, что у данных ферментов остаток His116, консервативный у МБЛ субкластеров B1 и B3, заменен на аспарагин.

Процесс эволюции БЛ способствовал развитию защитных механизмов бактерий и потере эффективности β-лактамных антибиотиков. Согласно прогнозам ВОЗ, смертность от инфекций, вызванных резистентными к антимикробным препаратам микроорганизмами, к середине XXI века может превысить смертность от рака, и человечество может вернуться в доантибиотическую эру [28]. Учитывая тот факт, что последний новый класс антибактериальных препаратов был открыт более 30 лет назад, разработка подходов возвращения активности β-лактамных антибиотиков является первоочередной задачей для практического здравоохранения всего мира.

Далее будут рассмотрены подходы к преодолению резистентности к β-лактамным антибиотикам на основе ингибирования действия БЛ.

ИНГИБИТОРЫ β-ЛАКТАМАЗ

Несмотря на различия в первичной структуре сериновых БЛ, механизм их действия консервативен, поэтому первоначально для поиска ингибиторов был использован принцип конкурентного ингибирования с использованием низкомолекулярных соединений, имеющих в структуре β-лактамное кольцо. Выбор ингибиторов состоял в поиске соединений, образующих более стабильный ацил-ферментный комплекс, не подверженный деацилированию.

Ингибиторы сериновых β-лактамаз I поколения. К ингибиторам БЛ I поколения относятся соединения на основе сульфонов и оксапенемов, имеющих в своей структуре β-лактамное кольцо (рис. 4, *а*). Основными представителями этой группы ингибиторов являются клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам.

Первым ингибитором сериновых БЛ является клавулановая кислота, обнаруженная в 1980-х гг. при скрининге природных соединений, выделенных из *Streptomyces clavuligerus* [29]. В своей структуре она имеет β-лактамное кольцо, конденсированное с 5-членным кольцом, содержащим атом кислорода и имеющим карбоксильную группу в качестве заместителя (рис. 4, *а*). Клавулановая кислота проявляет небольшую собственную антимикробную активность, однако при использовании ее в комбинации с амоксициллином минимальная подавляющая кон-

центрация (МПК) антибиотика уменьшается в отношении различных грамотрицательных бактерий, продуцирующих БЛ класса А [30]. Позже были синтезированы другие соединения этой группы – сульбактам и тазобактам [31, 32]. Эти два ингибитора являются сульфонами пенициллановой кислоты и имеют β-лактамное кольцо, конденсированное с 5-членным кольцом, содержащим карбоксильную группу (рис. 4, *а*). Они отличаются по заместителю в положении С2, который у сульбактама представляет собой метильную группу, а у тазобактама – триазолилсодержащий фрагмент.

Все три соединения являются ингибиторами сериновых БЛ класса А и обладают различной ингибирующей способностью: клавулановая кислота и тазобактам обладают сравнимой ингибирующей активностью в отношении ферментов типов TEM, SHV и CTX-M и более эффективны, чем сульбактам [33]. Однако сульбактам имеет более высокую собственную антибактериальную активность, т.е. взаимодействует с ПСБ. Сульбактам и клавулановая кислота обладают низкой ингибирующей активностью в отношении KPC и других сериновых карбапенемаз класса А.

Новым представителем класса β-лактамных ингибиторов является производное тазобактама – энметазобактам, представляющий собой метилированный сульфон пенициллановой кислоты (рис. 4, *а*). Он характеризуется улучшенными свойствами проникновения в бактериальную клетку и обладает активностью против многих сериновых БЛ класса А, особенно БЛРС [34].

Все представители ингибиторов I поколения имеют общий механизм ингибирования сериновых БЛ класса А (рис. 4, *б*) [17]. Связывание молекул β-лактамных ингибиторов в активном центре фермента происходит аналогично β-лактамным антибиотикам. На начальном этапе образуется нековалентный комплекс (E : I), карбоксильный фрагмент молекулы ингибитора располагается в консервативной области активного центра, он связывается водородными связями с остатками Thr235 и Ser130 и находится в пределах расстояний электростатического взаимодействия от остатков Arg244 и Lys234 [35]. Карбонильный кислород располагается в оксианионном кармане, образованном атомами азота пептидного остова остатков Ser70 и Ala237, тем самым ориентируя карбонильный углерод для нуклеофильной атаки каталитическим Ser70 и образования ацил-фермента E–I [36]. Существует три возможных пути дальнейших превращений ацил-ферментного комплекса: необратимая инактивация (E–I*), обратимая инактивация с образованием таутомера E–T и медленное деацилирование с регенерацией активного фермента E. Идеальным является ингибитор, у которого преимущественной является необратимая инактивация.

В качестве примера (рис. 4, *в*) представлен механизм ингибирования сериновых БЛ класса А клавулановой кислотой. Образование ацил-ферментного комплекса происходит аналогично взаимодействию β-лактамных антибиотиков: активация гидроксильной группы серина протекает с участием остатков Lys73, Ser130 и Glu166 [22]. После ацилирования молекула ингибитора подвергается β-элиминации, что приводит к раскрытию 5-членного оксазольного кольца с образованием переходного промежуточного имин-ацил-фермента. Этот комплекс может подвергаться таутомеризации с образованием промежуточных енаминов в *транс*- или *цис*-конформации. *Транс*- и *цис*-енамины имеют сопряженную систему двойных связей с карбонильной связью, что затрудняет нуклеофильную атаку молекулой воды карбонильного углерода и препятствует быстрому деацилированию [37]. В зависимости от строения активного центра БЛ и свойств ингибитора промежуточный имин/енаминовый комплекс может претерпевать ряд перегруппировок с образованием в результате неактивных форм фермента или подвергаться медленному деацилированию с регенерацией активной БЛ. Существует несколько возможностей необратимой инактивации: образование комплексов фермента с фрагментами ингибитора с молекулярной массой 70 или 88 Да, присоединенными к Ser70; декарбоксилирование енаминной формы и последующий медленный гидролиз образовавшихся сложных эфиров; нуклеофильная атака Ser130 линейного имин-ацильного комплекса фермента, в результате чего происходит фрагментация ингибитора и образуется комплекс фермента с фрагментом ингибитора с молекулярной массой 52 Да. Этот комплекс подвергается дальнейшей деградации, что приводит к нескольким формам инактивированного фермента.

Ингибиторы I поколения эффективны в отношении сериновых БЛ класса А, но мало эффективны в отношении сериновых БЛ классов С и D. Только тазобактам обладает невысокой активностью в отношении БЛ класса С [38], а его производное – энметазобактам – может ингибировать некоторые БЛ OXA-типа [34]. Поскольку строение активного центра МБЛ кардинально отличается от сериновых БЛ, ингибиторы этой группы неактивны в отношении этих ферментов и, более того, являются субстратами для МБЛ, т.е. гидролизуются ими [39].

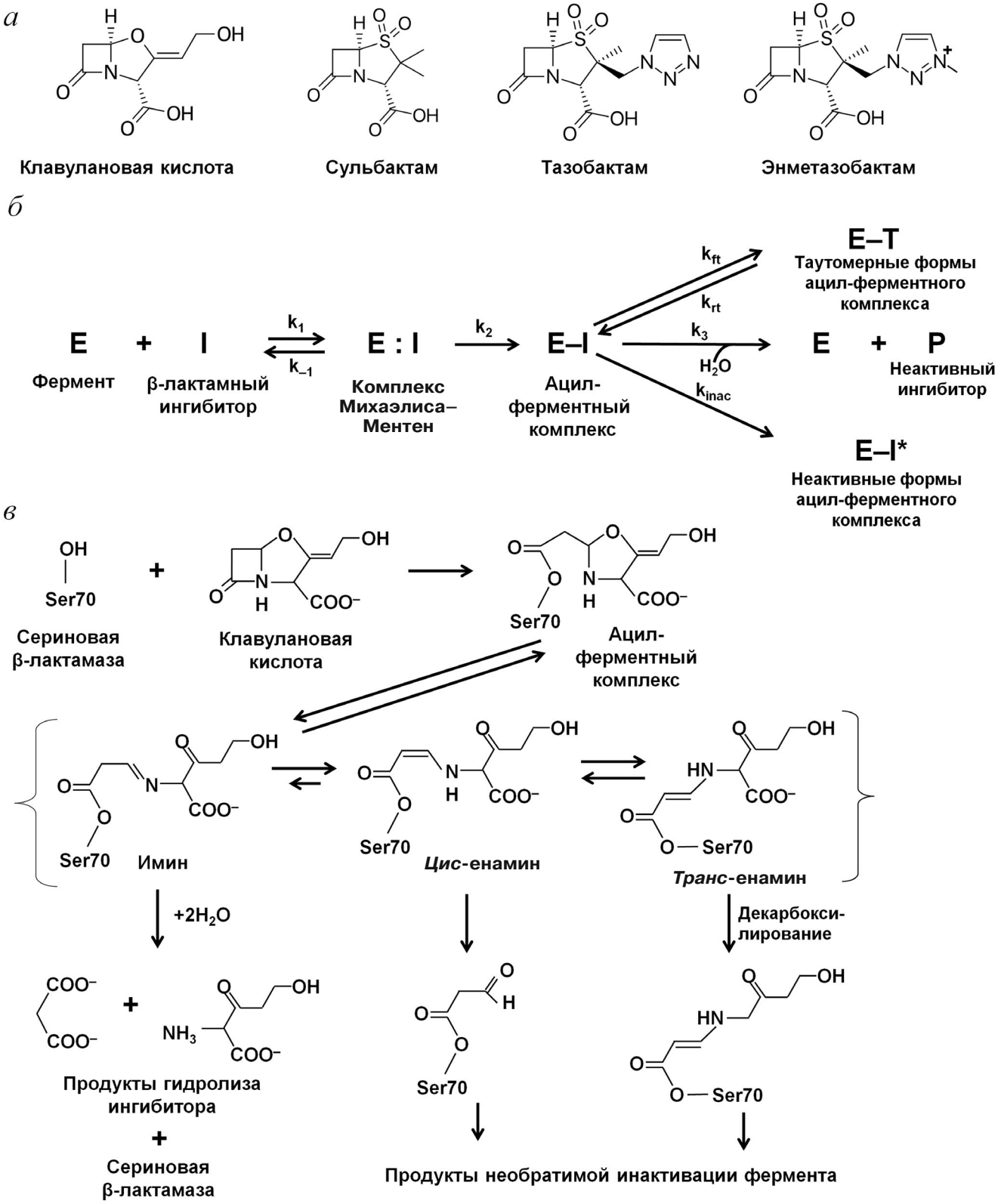


Рис. 4. *а* – Структурные формулы β-лактамных ингибиторов I поколения, *б* – схема ингибирования сериновых β-лактамаз класса А β-лактамными ингибиторами, *в* – механизм ингибирования β-лактамаз класса А клавулановой кислотой и пути превращений ацил-ферментного комплекса

Ингибирующее действие фармацевтических комбинаций ингибиторов I поколения с β-лактамами. Все описанные выше β-лактамные ингибиторы применяются в клинической практике в фармацевтических комбинациях с антибиотиками. Принцип выбора сочетаний антибиотик/ингибитор основан на подборе соединений, обладающих сходными фармакокинетическими свойствами, т.е. они действуют либо одновременно, либо ингибитор связывается с ферментом раньше субстрата. В настоящее время широко используются следующие фармацевтические комбинации: амоксициллин/клавулановая кислота, тикарциллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам и пиперациллин/тазобактам [40, 41]. Недавно была одобрена новая комбинация с новым антибиотиком группы цефалоспоринов (цефтолозан/тазобактам), показавшая свою эффективность для лечения осложненных инфекций [42]. Ее преимуществами являются высокая активность против БЛРС-продуцирующих бактерий семейства Enterobacteriaceae и *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [43, 44]. На третьей фазе клинических исследований находится комбинация с новым β-лактамным ингибитором (цефепим/энметазобактам), показавшая активность *in vitro* при подавлении устойчивости штаммов семейства Enterobacteriaceae, продуцирующих карбапенемазы KPC-типа [45].

Несмотря на положительный опыт использования в клинической практике комбинаций пенициллинов и цефалоспоринов с β-лактамными ингибиторами I поколения против сериновых БЛ класса A, которые остаются самыми распространенными, в последние годы стало очевидно, что данный подход имеет серьезные ограничения. Для всех ингибиторов β-лактамной природы были обнаружены медленные стадии деацилирования ацил-ферментных комплексов, т.е. ни один из них не является необратимым. Эволюция механизмов резистентности у сериновых БЛ привела к появлению мутаций некоторых периферийных остатков (например, остатков 69, 130, 244, 275 и 276 у БЛ TEM-типа), которые приводят к устойчивости к ингибиторам β-лактамной природы [13]. Мутации некоторых остатков БЛ разрушают сеть водородных связей, участвующих в депротонировании Ser70 и таким образом затрудняют образование ацил-ферментного комплекса. Другие мутации БЛ изменяют распределение заряженных групп, что приводит к смещениям положения молекулы воды и снижению сродства к ингибиторам.

Подход к поиску конкурентных ингибиторов на основе аналогов субстратов, действующих по такому же механизму, оказался принципиально ограниченным: ацил-ферментные комплексы с данными ингибиторами могут разрушаться по другим механизмам, и широкое использование ингибиторов в составе фармацевтических комбинаций стимулировало развитие резистентности к ним. Кроме этого, существуют трудности поиска подходящих комбинаций антибиотик/ингибитор, выбор пар является ограниченным из-за различий в фармакокинетических свойствах.

Огромным вызовом для клинической медицины явилось появление мультирезистентных возбудителей инфекционных заболеваний, устойчивых одновременно к разным классам антибиотиков. Как правило, эти бактерии являются продуцентами нескольких БЛ, относящихся к разным классам, и поэтому использование для их подавления ингибиторов β-лактамной природы ограничено из-за узкой специфичности, отсутствия активности в отношении БЛ классов B, C и D, а также способности МБЛ разрушать данные ингибиторы. Для подавления мультирезистентных патогенов была разработана новая группа β-лактамных препаратов – карбапенемы (рис. 1), и для лечения тяжелых инфекций было предложено использовать их комбинации. Первой была комбинация эртапенема и высоких концентраций дорипенема или меропенема, использованная для подавления мультирезистентных бактерий семейства Enterobacteriaceae [46]. Предполагаемый механизм действия данного сочетания препаратов заключается в том, что эртапенем, характеризующийся высоким сродством к карбапенемазам KPC-типа, образует с ними стабильный комплекс и ингибирует их, в то время как меропенем или дорипенем действуют как антибактериальные препараты на ПСБ и подавляют рост бактерий. На модельных клетках *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что данные двойные комбинации снижают бактериальный рост клеток на три и один порядок величины соответственно. Клинические исследования подтвердили эффективность данной комбинированной терапии в сравнении с другими антибактериальными препаратами, однако только в отношении патогенов, продуцирующих БЛ KPC-типа [47].

Новое поколение ингибиторов. Появление новой группы β-лактамных антибиотиков – карбапенемов для лечения тяжелых внутрибольничных инфекций привело к появлению новых БЛ – карбапенемаз, способных их гидролизовать. По своему строению данные ферменты очень разнообразны и относятся к разным молекулярным классам. В связи с ростом продуцирующих карбапенемазы бактерий-возбудителей

инфекционных заболеваний требовалось создание новых ингибиторов с более широкой ингибирующей специфичностью по сравнению с β-лактамными ингибиторами I поколения.

Ингибиторы группы диазобициклооктанов. Первые не β-лактамные ингибиторы сериновых БЛ, относящиеся к классу мостиковых диазабициклооктанов (ДБО), были предложены в середине 1990-х гг. [48]. К настоящему времени эта группа включает авибактам, релебактам, накубактам, зидебактам и дурлобактам (рис. 5, *а*), их общим структурным элементом является 5-членное бициклическое ядро ДБО. Различия между ингибиторами определяются типом заместителей у атома C2, у дурлобактама в ядре ДБО имеется двойная связь. В отличие от карбоксильной группы в β-лактамных ингибиторах, у данных ингибиторов имеется отрицательно заряженная сульфатная группа.

Механизм ингибирования БЛ обусловлен взаимодействием серина активного центра с амидной группой кольца ДБО (рис. 5, *б*). Правильная ориентация молекулы ингибитора в активном центре фермента обеспечивается сохранением расстояния между карбонильным кислородом и отрицательно заряженным атомом кислорода сульфатной группы, которое аналогично расстоянию между эквивалентными атомами (карбонильным кислородом и кислородом карбоксильной группы) в ингибиторах β-лактамной природы. Карбоксамидная боковая цепь взаимодействует с заряженными остатками Asn/Gln, входящими в состав триады консервативных остатков с участием каталитического серина (Ser-X-Asn) и Ω-петли. В результате образования ацил-ферментного комплекса с каталитическим серином происходит разрыв связи C7-N6 и раскрытие 5-ти членного кольца ДБО [49].

Существует несколько отличий в строении ацил-ферментных комплексов БЛ с ингибиторами ДБО по сравнению с комплексами с β-лактамными ингибиторами: сульфатная группа взаимодействует с консервативной триадой остатков Lys-Thr-Gly, атом N6 взаимодействует с консервативными остатками Ser130 сериновых БЛ класса A или Tyr150 сериновых БЛ класса C. Образование дополнительных связей молекулы ингибитора в активном центре фермента обусловливает их более широкую специфичность в отношении БЛ разных классов.

У ингибиторов данного типа наблюдается изменение механизмов модификации ацил-ферментного комплекса: в БЛ класса A атом азота молекулы ингибитора образует водородную связь с молекулой воды, в результате чего остаток Glu166 Ω-петли находится в протонированном состоянии, что делает невозможным дальнейшее деацилирование с участием остатков петли [50]. Гидролиз молекулы ингибитора также затруднен вследствие наличия в ароматической системе атома азота, связанного с атомом углерода карбонильной группы. Для этих ингибиторов возможны два других пути разрушения ацил-ферментного комплекса (рис. 5, *в*): рециклизация кольца ДБО с высвобождением нативной молекулы ингибитора, которая дальше может опять взаимодействовать с ферментом; и медленное десульфатирование, в результате которого молекула ингибитора гидролизуется и не может больше участвовать в подавлении активности БЛ. Рециклизация наблюдается у БЛ классов C и A, за исключением ферментов KPC-типа, у ферментов класса D этот процесс протекает существенно медленнее [50]. У ферментов KPC-типа преимущественно происходит десульфатирование.

Авибактам. Преимуществами авибактама перед β-лактамными ингибиторами I поколения являются высокая активность против клинически значимых БЛ CTX-M-15 класса A и БЛ AmpC класса C, а также длительный период полувыведения [51]. Использование авибактама в комбинации с цефтазидимом было эффективно против мультирезистентных бактерий семейства Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa* [52]. В то же время авибактам не способен инактивировать МБЛ и большинство ферментов класса D (кроме OXA-48), поэтому данная комбинация не может быть использована против карбапенем-резистентных штаммов *Acinetobacter* spp. и *P. aeruginosa*, а также против МБЛ-продуцирующих штаммов Enterobacteriaceae [53].

В настоящее время проводятся испытания фармацевтической комбинации азтреонам/авибактам в отношении мультирезистентных штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих сериновые БЛ совместно с МБЛ [54]. Этот выбор обусловлен тем, что МБЛ не гидролизуют монобактамы, а авибактам добавляется для ингибирования БЛРС и сериновых карбапенемаз.

Релебактам. Релебактам отличается от авибактама наличием пиперидинового кольца. Он используется в комбинации с имипенемом для лечения осложненных инфекций мочевыводящих путей и интраабдоминальных инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам штаммами Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa*, продуцирующими БЛ KPC-типа класса A и БЛ класса C [55]. Комбинация имипенем/релабактам показала хорошую активность в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter* spp., устойчивых к имипенему вследствие экспрессии БЛРС или БЛ AmpC класса C и нарушения про-

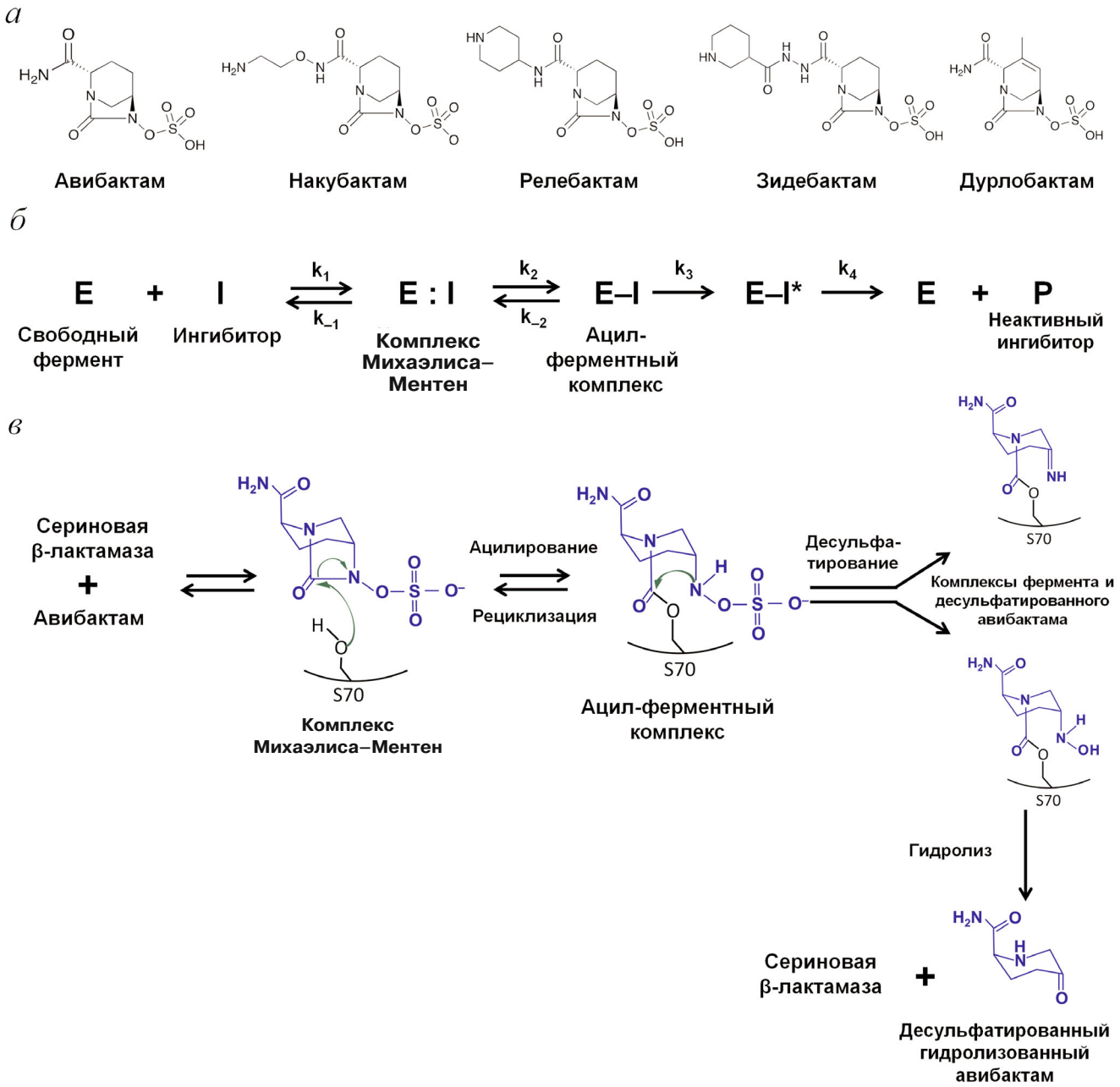


Рис. 5. *а* – Структурные формулы ингибиторов группы диазобициклооктанов, *б* – схема обратимого ингибирования сериновых β-лактамаз авибактамом, *в* – механизм ингибирования сериновых β-лактамаз авибактамом

ницаемости клеточной стенки. Однако эта комбинация была неэффективной для штаммов Enterobacteriaceae, экспрессирующих БЛ OXA-48 или МБЛ [56].

Накубактам, зидебактам, дурлобактам. К новым ингибиторам группы ДБО относятся накубактам, зидебактам и дурлобактам. К их преимуществам можно отнести собственную антибактериальную активность, обусловленную взаимодействием с некоторыми ПСБ. Комбинации накубактама с меропенемом и зидебактама с цефепином проявляют активность против сериновых БЛ классов A и C, а также МБЛ [57, 58]. Зидербактам может ингибировать β-лактамазу OXA-48 класса D. Дурлобактам был специально разработан для расширения спектра ингибирования в отношении различных БЛ класса D (OXA-48 бактерий семейства Enterobacteriaceae и OXA-23/24/58 *Acinetobacter baumannii*) [59]. Этот ингибитор используется в комбинации с сульбактамом, который, кроме способности ингибировать сериновые БЛ класса A, имеет анти-

бактериальную активность и связывается с некоторыми ПСБ у *Acinetobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenza* [60]. Показано, что комбинация этих двух ингибиторов обеспечивает хорошую активность против множественной лекарственной устойчивости у *A. baumannii*.

Ингибиторы – производные бороновых кислот. Новой группой ингибиторов БЛ являются соединения бороновых кислот, обладающие способностью ингибировать сериновые протеазы микроорганизмов [61], однако у первых ингибиторов этой группы наблюдались побочные эффекты, связанные с ингибированием сериновых протеаз млекопитающих. Для улучшения специфичности действия в отношении БЛ были изучены циклические боронаты (рис. 6, *а*). Первым соединением, показавшим активность против сериновых БЛ класса А (типов CTX-M, SHV, TEM и KPC), БЛ класса С, но не ингибировавшим сериновые протеазы млекопитающих, был ваборбактам [62].

При связывании ингибитора группы производных бороновых кислот в активном центре фермента его карбоксильный фрагмент располагается в карбоксил-связывающем кармане, атомы ароматической системы формируют гидрофобные контакты с боковыми группами остатков Tyr/Trp, амидная группа взаимодействует с остатками Ser237, Asn132 и Asn102 аналогично амидной группе пенициллинов [61]. Известно, что борная кислота может образовывать ковалентные связи со спиртами, поэтому атом бора ингибитора имитирует карбонильный углерод в β-лактамах и является мишенью нуклеофильной атаки гидроксильной группы каталитического серина. В результате образуется тетраэдрический комплекс, в котором серин ковалентно связан с атомом бора – аналог переходного состояния ацил-ферментного комплекса БЛ с β-лактамами (рис. 6, *б*). По принципу действия данные соединения являются ингибиторами переходного состояния, поскольку их комплекс с ферментом имеет тетраэдрическую конформацию, имитирующую переходное состояние тетраэдрического оксианиона в реакциях ацилирования и деацилирования [63].

В результате скрининга циклических боронатов были выявлены ингибиторы всех четырех классов БЛ, включая МБЛ [64, 65]. К преимуществам этих ингибиторов относится также их способность ингибировать ПСБ5 [61]. Ингибитор таниборбактам (VNRX-5133) проявляет активность в отношении сериновых БЛ классов А и С, отдельных карбапенемаз класса D (OXA-48) и МБЛ типов VIM и NDM, продуцируемых карбапенем-резистентными бактериями семейства Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa* [66]. Этот ингибитор показал в 50–50 000 раз более высокую эффективность в отношении клинически значимых МБЛ по сравнению с ваборбактамом.

Рентгеноструктурный анализ комплексов двух клинически значимых БЛ (сериновой БЛ CTX-M-15 и МБЛ VIM-2) с таниборбактамом показал, что при образовании тетраэдрических интермедиатов с участием атома бора и каталитического серина БЛ CTX-M-15 или иона Zn^{2+} в МБЛ VIM-2 наблюдаются дополнительные стабилизирующие взаимодействия, например N-(2-аминоэтил)циклогексиламиновой части ингибитора с отрицательно заряженными а.о. (Glu149 в МБЛ VIM-2 и NDM-1) [67]. Комбинация цефепим/таниборбактам показала активность как *in vitro*, так и *in vivo* против БЛРС и карбапенемазо-продуцирующих штаммов Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa* [66].

Новым ингибитором группы циклических боронатов является QPX7728, проявляющий широкую ингибирующую специфичность против БЛРС и карбапенемаз класса А и БЛ класса С с эффективностью сопоставимой или превышающей эффективность ингибиторов группы ДБО (авибактама, релебактама и ваборбактама) [68]. В отличие от других ингибиторов, QPX7728 также является эффективным ингибитором карбапенемаз класса D, в частности OXA-48 бактерий семейства Enterobacteriaceae и OXA-23/24/58 *A. baumannii*, а также МБЛ (NDM, VIM, IMP и других). Расширение спектра ингибирования QPX7728 может быть обусловлено его более компактной структурой и отсутствием объемных заместителей, что позволяет молекуле полностью входить в активный центр фермента.

Обобщающая информация о специфичности действия ингибиторов сериновых БЛ приведена в таблице. Ингибиторы I поколения активны в основном против БЛ класса А, за исключением карбапенемаз. Новый ингибитор этой группы – энметазобактам – активен в отношении карбапенемаз класса А KPC-типа и некоторых БЛ класса D OXA-типа. Отличием ингибиторов нового поколения групп ДБО и производных бороновых кислот является более широкая специфичность: они активны против сериновых БЛ и карбапенемаз класса А, БЛ класса С, ряда БЛ и карбапенемаз класса D, а также МБЛ.

Ингибиторы металло-β-лактамаз. Особенностью последних десятилетий является растущее распространение мульти- и пан-резистентных грамотрицательных патогенных бактерий, которые синтезируют несколько БЛ. Среди них особую роль играют высокоактивные МБЛ с широкой субстратной специфичностью в отношении практически всех групп β-лактамов. Ин-

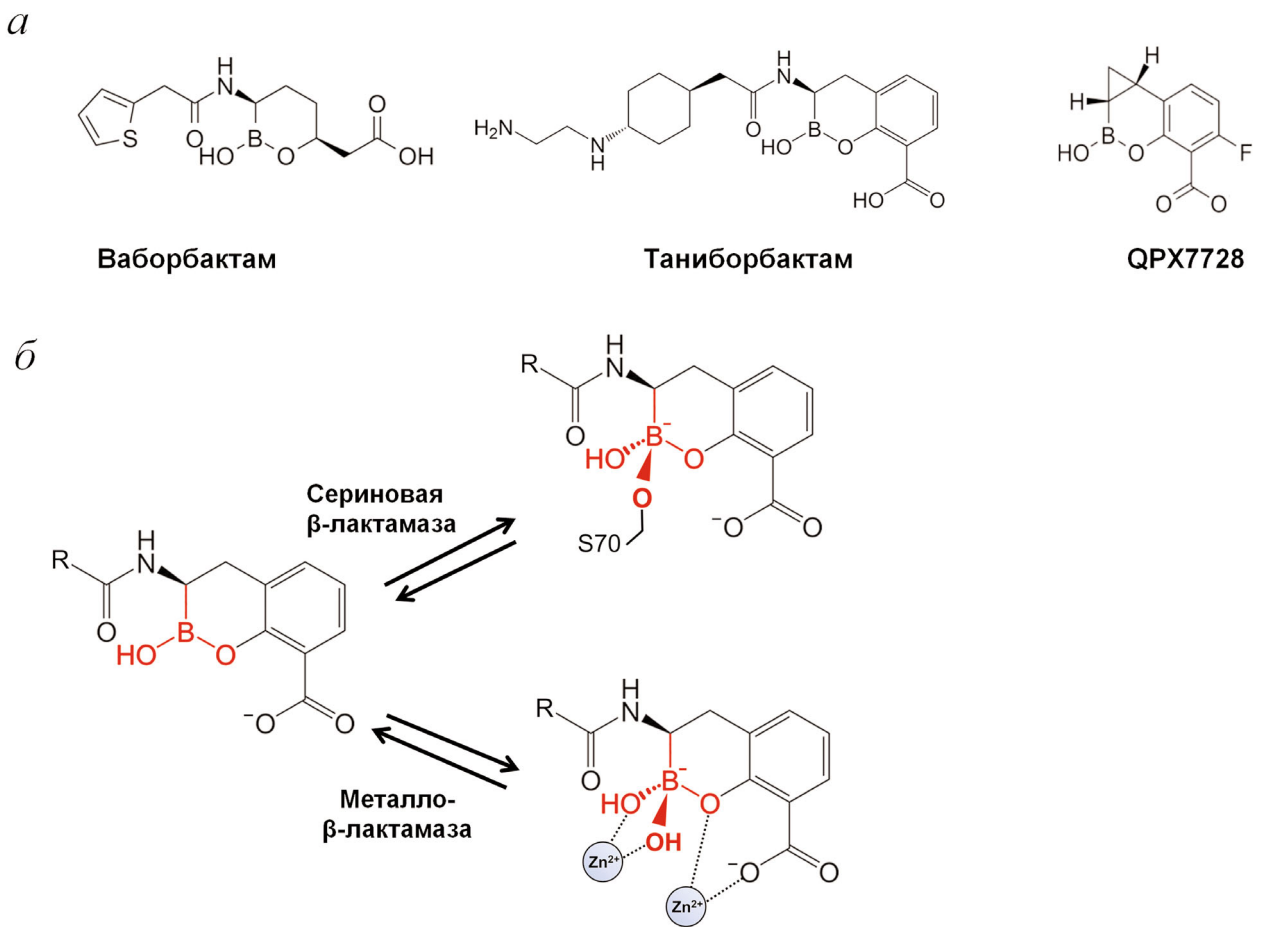


Рис. 6. *а* – Структуры циклических производных бороновых кислот – ингибиторов β-лактамаз. *б* – Образование тетраэдрического ацил-ферментного комплекса атома бора производных бороновых кислот с серином активного центра β-лактамазы и ионом Zn^{2+} металло-β-лактамазы

гибиторы сериновых БЛ I поколения практически неактивны в отношении МБЛ класса B, в связи с чем особо актуальным является поиск ингибиторов данных ферментов [69, 70]. К настоящему времени описаны уже несколько сотен химических соединений – ингибиторов МБЛ, однако ни одно из них не зарегистрировано для клинического применения [16]. Сложность разработки связана со структурным разнообразием ферментов и различиями в механизмах гидролиза. Существуют две основные стратегии поиска потенциальных ингибиторов МБЛ: связывание с ионами Zn^{2+} и Zn^{2+}-независимое связывание с белком, каждая имеет свои ограничения. Zn-зависимые ингибиторы чаще проявляют неспецифические эффекты, поскольку металло-зависимые ферменты очень распространены в биохимических процессах человека. Поиск Zn-независимых ингибиторов с широкой специфичностью затруднен в связи с ограниченным количеством консервативных аминокислот у МБЛ разных типов и формой активного центра в виде широкого кармана. Кроме того, двухвалентные катионы (Ca^{2+}, Mg^{2+}), циркулирующие в высоких концентрациях (порядка мМ) в плазме крови и тканях, могут конкурировать за связывание с Zn-зависимыми ингибиторами.

Zn-зависимые ингибиторы. Zn-зависимые ингибиторы МБЛ разделяются на группы по механизму действия на фермент: 1) хелатирующие агенты, экстрагирующие ионы металлов из активного центра, 2) ингибиторы, конкурирующие с антибиотиками за связывание с ионами металла и а.о. активного центра.

Хелатирующие агенты. Распространенным способом ингибирования МБЛ является удаление ионов Zn^{2+} из активного центра хелатирующими агентами. Наиболее известный хелат – ЭДТА – из-за высокой токсичности непригоден для терапевтического применения и используется только для идентификации МБЛ при диагностике резистентных бактерий [71]. Другим примером подобных ингибиторов являются цинк-селективные аналоги спиродигидроиндо-

Активность ингибиторов сериновых β-лактамаз и МБЛ

Ингибитор	β-Лактамазы, классы/типы				
	Сериновые БЛ				МБЛ
	A		C	D	B
	БЛРС	КРС	AmpC	OXA	
Сульфон-замещенные β-лактамы					
Клавулановая кислота	+	–	–	–	–
Сульбактам	+	–	–	–	–
Тазобактам	+	–	–	–	–
Энметазобактам	+	+	–	+/–	–
Ингибиторы группы диазобициклооктанов					
Авибактам	+	+	–	+/–[1]	–
	+	+	–	+/–[1]	–
Релебактам	+	+	–	–	–
Накубактам	+	+	+	+/–[1]	+
Зидебактам	+	+	–	+/–[1]	–
Дурлобактам	+	+	–	+	–
Производные бороновых кислот					
Ваборбактам	+	+	–	–	–
Таниборбактам	+	+	+	+/–[1]	+
QPX7728	+	+	+	+	+

[1] БЛ OXA-48 (БЛ OXA-23, OXA-24/40 и OXA-58 не ингибируются)

ла-тиадиазола, эффективность которых показана на мышиных моделях [72].

Одним из многообещающих хелатирующих агентов является природное соединение аспергилломаразмин A (AMA), которое может эффективно ингибировать МБЛ типов NDM, VIM и IMP [73, 74]. Действие AMA состоит в экстракции Zn^{2+} из активного центра ферментов, при этом 2 эквивалента AMA могут эффективно удалять 1 эквивалент Zn^{2+} (рис. 7, *а*).

Известны другие хелатирующие агенты, такие как 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA) и 1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусная кислота (NOTA) [75] и их производные [76], которые в комбинации с меропенемом проявляют активность в отношении различных патогенных бактерий, продуцирующих МБЛ. Все эти соединения характеризуются низкой токсичностью в отношении клеток млекопитающих.

Zn-связывающие соединения. Наиболее перспективными ингибиторами МБЛ являются подробно описанные в предыдущем разделе производные циклических бороновых кислот, ингибирующие как сериновые БЛ, так и МБЛ [64]. Широкая специфичность ингибирования показана для их аналогов, циклобутанонов [77].

Еще одной группой Zn-связывающих ингибиторов с высокой константой комплексообразования являются соединения, содержащие тиоловые группы [78, 79]. К ним относится известный лекарственный препарат L-каптоприл – ингибитор ангиотензин-превращающего фермента [80]. Наиболее эффективным в отношении МБЛ среди четырех диастереомеров каптоприла оказался D-каптоприл, который ингибирует *in vitro* МБЛ субкластеров B1 и B3, но не B2 [81]. Это объясняется различиями в механизме действия (рис. 7, *б*): в комплексе с бицинковой МБЛ NDM-1 (субкластер B1) тиоловая группа D-каптоприла связывает два иона Zn^{2+} и, таким образом, замещает нуклеофильный гидроксид [82], в комплексе с моноцинковой БЛ CphA (субкластер B2) тиоловая группа D-каптоприла взаимодействует с гидрофобными остатками активного центра фермента, а ион Zn^{2+} очень слабо координируется его карбоксильной группой [83].

В качестве потенциальных ингибиторов МБЛ широкого спектра действия рассматриваются некоторые азотсодержащие гетероциклические соединения, в частности имеющие азолил-тиоацетамидный каркас [84]. Ингибирующая активность этих соединений была показана в отношении МБЛ NDM-1 и VIM-2.

Высокую связывающую способность в отношении ионов Zn^{2+} продемонстрировали фосфонатсодержащие соединения (6-фосфонометилпиридин-2-карбоксилаты): значения констант ингибирования МБЛ *in vitro* находятся в наномолярном диапазоне [85]. Аналогичными значениями констант связывания ионов Zn^{2+} характеризуются производные карбоновых кислот (нитрилтриуксусная кислота и N-(фосфонометил)иминодиуксусная кислота), активные *in vitro* в отношении ферментов типов NDM, VIM и IMP. Однако маловероятно, что такие сильные Zn-связывающие низкомолекулярные карбоксилаты будут использоваться в качестве лекарственных препаратов, скорее всего они станут основой пролекарств, активирующихся при проникновении в бактериальную клетку.

Zn-независимые ингибиторы. К Zn-независимым ингибиторам относятся активированные эфиры 3-меркаптопропионовой кислоты, взаимодействующие с консервативным остатком

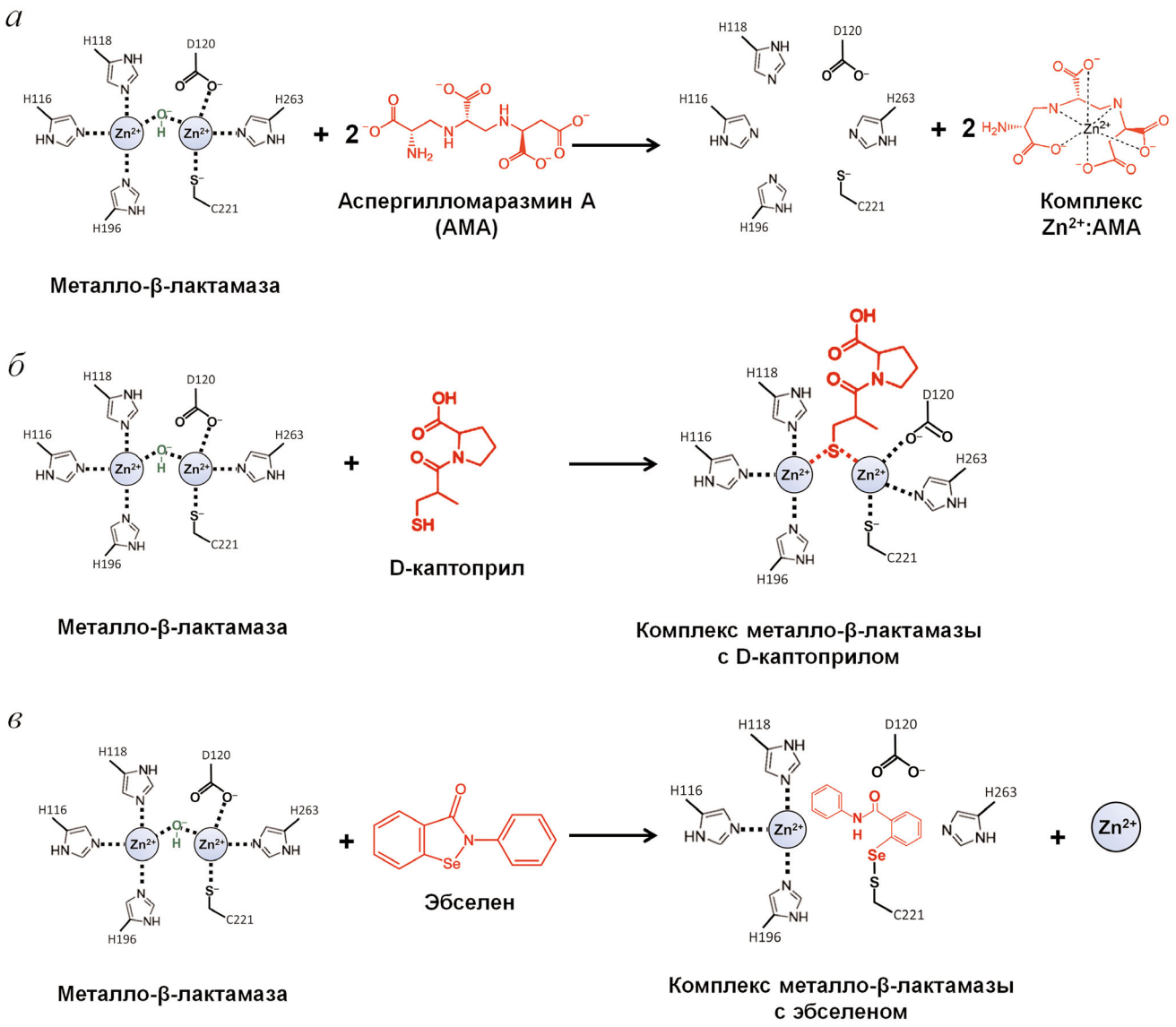


Рис. 7. Схема ингибирующего действия аспергилломаразмина А (*а*), D-каптоприла (*б*) и эбселена (*в*) в отношении металло-β-лактамаз

Lys224 в активном центре МБЛ субкластера B1 [86]. Селен-содержащий ингибитор эбселен эффективно ингибирует БЛ NDM-1, образуя ковалентную связь Se–S с остатком активного центра Cys221 (рис. 7, *в*) [87]. Найдены ингибиторы МБЛ субкластеров B1 и B2, взаимодействующие одновременно с Lys224 и Cys221 [88].

В качестве ингибитора МБЛ предложено использовать коллоидный раствор сульфата висмута, принцип действия которого основан на вытеснении Zn^{2+} из активного центра NDM-1 с образованием неактивного комплекса Bi^{3+} [89]. Важно отметить, что эбселен и коллоидный сульфат висмута используются в клинических целях для терапии других патологий, что упрощает процесс клинических исследований при регистрации препаратов на их основе.

Главным преимуществом новых ингибиторов не β-лактамной природы является их широкая ингибирующая специфичность в отношении БЛ разных молекулярных классов (таблица). Некоторые из них имеют собственную антибактериальную активность и действуют синергетически в комбинации с β-лактамными антибиотиками, что позволяет дать им «вторую жизнь» при лечении тяжелых инфекций, вызванных мультирезистентными микроорганизмами [90].

Несмотря на достигнутый прогресс, создание препаратов для ингибирования МБЛ *in vivo*

всё еще остается сложной задачей, в том числе из-за необходимости снижения их сродства к другим Zn-содержащим металло-ферментам, например ангиотензин-превращающему ферменту.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОЗДАНИЯ ИНГИБИТОРОВ β-ЛАКТАМАЗ

Начало эпохи применения антибиотиков в клинической практике было чрезвычайно успешным: для борьбы с бактериями, вызывающими инфекционные заболевания, было синтезировано несколько десятков тысяч различных антибиотиков, многие из которых стали производиться в промышленных масштабах. Однако спустя 50 лет активного применения антибактериальных препаратов произошло катастрофическое изменение бактерий и появление форм, устойчивых к антибиотикам и обладающих более выраженной патогенностью и вирулентностью при действии на организм человека и животных. К этому привело недостаточное знание и непонимание биохимических и генетических механизмов экологической адаптации бактерий к токсическим веществам, в том числе к антибиотикам. Несмотря на дальнейшие поиски новых антибиотиков, резистентность бактерий остается непреодолимой, и ее главными механизмами являются ферментативный гидролиз и модификация антибиотиков, а также модификация мишеней, на которые воздействуют антибиотики [7]. Подход для преодоления устойчивости грамотрицательных бактерий к β-лактамам, основанный на использовании ингибиторов ферментов БЛ, был предложен около 50 лет назад. Несмотря на успешное применение ингибиторов I поколения, их использование стало ограниченным из-за узкой специфичности и развития к ним резистентности. Новое поколение ингибиторов оказалось более успешным и позволило вернуть β-лактамы в практическое использование при комбинировании их с ингибиторами. Однако и первое, и второе поколение ингибиторов были направлены против активных центров БЛ, и поэтому они, также как и антибиотики, оказались под давлением механизмов резистентности.

Новыми перспективными подходами в поиске новых ингибиторов БЛ не β-лактамной природы являются использование методов компьютерного моделирования и виртуальный скрининг для поиска новых мишеней и эффективных лигандов для них. Виртуальный скрининг на основе изменения структурного остова лигандов с использованием набора дескрипторов для описания характеристик молекул позволил найти структурные аналоги известных аллостерических ингибиторов БЛ класса А [91]. Были найдены два новых ингибитора не β-лактамной природы, относящиеся по структуре к другим химическим классам, но проявляющие сходную биологическую активность в отношении тех же мишеней и показавшие более высокую эффективность в отношении БЛ ТЕМ-типа по сравнению со стартовыми молекулами [92, 93].

Активное изучение структурных и функциональных особенностей БЛ с использованием новейших методов структурной биологии, физико-химической биологии и молекулярного моделирования позволяет выявить новые поверхностные «горячие точки» белковой глобулы БЛ и использовать их в качестве новых мишеней для воздействия на активность и стабильность. В качестве таких мишеней интерес представляют подвижные петли, мутации в которых могут способствовать изменению каталитических функций и появлению новых свойств ферментов. У сериновых БЛ такой мишенью может являться Ω-петля, форма которой обеспечивается фиксацией концевых аминокислот на сближенном расстоянии друг от друга. Петли подобной формы описаны у 60 белков, для некоторых из них установлены функции аллостерического регулирования [94]. Ω-Петля сериновых БЛ расположена у входа в активный центр фермента и включает каталитически важный консервативный остаток Glu166, мутации которого приводят к практически полной потере активности фермента. Ω-Петля принимает участие на всех стадиях каталитического цикла гидролиза, при этом ее роль особенно критична на стадии деацилирования и высвобождения гидролизованной молекулы антибиотика [95]. Несмотря на различия в аминокислотной последовательности БЛ разных типов, пространственная укладка их Ω-петли одинакова. Исходя из структуры и функций Ω-петли, ее можно рассматривать как «мозаичную» модель мишеней для действия аллостерических ингибиторов.

Поиск аллостерических ингибиторов ведется и для МБЛ, хотя на данный момент пока точно не установлены мишени для воздействия на это семейство ферментов [96]. Показано, что ряд трициклических природных соединений из экстракта грибов *Chaetomium funicola* могут быть ингибиторами некоторых МБЛ (IMP-1 из *Bacillus cereus* II и *P. aeruginosa*, CfiA из *Bacteroides fragilis*) с достаточно низкими константами ингибирования (порядок нескольких мкМ) [97]. Одно соединение имело сродство к петле, расположенной около активного центра

фермента. В качестве аллостерических ингибиторов также исследуются макромолекулы (пептиды, наноантитела, аптамеры), направленные на участки, удаленные от активного центра. Методом фагового дисплея было найдено наноантитело, эпитопом которого являются фрагменты петли L6 и α2-спирали, способное ингибировать активность МБЛ VIM-4 со значением K_i в микромолярном диапазоне [98]. Новым подходом к ингибированию является использование конструкций на основе самоорганизации ДНК, которые ингибировали МБЛ разных классов, включая NDM-1, со значениями IC_{50} ~10 нМ [99].

Ожидаемое мировое расширение производства промышленных β-лактамных антибиотиков неизбежно приведет к появлению не только новых БЛ, но и к дальнейшей мутационной изменчивости существующих ферментов. Уже сейчас наблюдается расширение разнообразия МБЛ класса B [9], образование гибридных молекул из различных БЛ [23–25]. Возможны другие варианты эволюции данного суперсемейства ферментов, их направления трудно предсказать. Выходом из этого положения должно стать изучение генетических механизмов синтеза и регуляции новых ферментов. Индукция синтеза БЛ представляет собой сложный процесс с участием самих антибиотиков, продуктов гидролиза самой бактериальной стенки, ферментов, принимающих участие в сигнальных путях и регулирующих процессы в бактериальных генах. Анализ этих процессов позволит выявить новые белки-мишени, ингибирование которых влияет на синтез БЛ. В связи с расширением генетических исследований механизмов регуляции биосинтеза бактериальных клеток это направление может оказаться весьма эффективным в создании новых антибактериальных препаратов, мишенью которых могут быть белки и нуклеиновые кислоты абсолютно специфические для микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Объем промышленного производства β-лактамных антибиотиков увеличивается, несмотря на рост резистентности бактерий к ним. Потребление β-лактамов, согласно мировым прогнозам, может удвоиться к 2030 г., что делает проблему создания ингибиторов БЛ на основе новых принципов и химических структур особенно актуальной. Перспективным для расширения специфичности ингибиторов в отношении разных БЛ является поиск новых мишеней, в том числе аллостерических, удаленных от активного центра фермента. Создание новых аллостерических ингибиторов и их совместное использование с антибиотиками позволит продлить «жизненный цикл» β-лактамов, терапевтическое действие которых хорошо изучено и характеризуется преимуществами в широкой специфичности действия, низкой токсичности и аллергенности по сравнению с другими антибиотиками.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом (грант № 15-14-00014-П, анализ ингибиторов сериновых β-лактамаз) и госзаданием МГУ имени М.В. Ломоносова (АААА-А16-116052010081-5, анализ ингибиторов металло-β-лактамаз).

Конфликт интересов. Авторы обзора заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith, P. W., Watkins, K., and Hewlett, A. (2012) Infection control through the ages, *Am. J. Infect. Control*, **40**, 35-42, doi: 10.1016/j.ajic.2011.02.019.
2. Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and β-lactam resistance, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 361-385, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.
3. Bush, K., and Bradford, P. A. (2016) β-Lactams and β-lactamase inhibitors: an overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Medici.*, **6**, a025247, doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
4. Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., and Laxminarayan, R. (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E3463-E3470, doi: 10.1073/pnas.1717295115.
5. URL: https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019.
6. King, D. T., Sobhanifar, S., and Strynadka, N. C. J. (2017) The Mechanisms of resistance to β-lactam antibiotics, in *Handbook of Antimicrobial Resistance* A (Berghuis, A., Matlashewski, G., Wainberg, M. A., and Sheppard, D., eds.), Springer New York, pp. 177-201, doi: 10.1007/978-1-4939-0694-9_10.
7. Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., and Rubtsova, M. Y. (2018) Bacterial enzymes and antibiotic resistance, *Acta Naturae*, **10**, 33-48.
8. Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., and Mobashery, S. (2014) Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resis-

tant *Staphylococcus aureus*, *IUBMB Life*, **66**, 572-577, doi: 10.1002/iub.1289.
9. Bush, K. (2018) Past and present perspectives on β-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **62**, e01076-18, doi: 10.1128/AAC.01076-18.
10. Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., and Hordijk, J. (2018) Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae, *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 1121-1137, doi: 10.1093/jac/dkx488.
11. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., and Monnet, D. L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin. Microbiol. Infect.*, **18**, 268-281, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
12. Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L., and Kantrowitz, E. R. (2005) Structure of the wild-type TEM-1 β-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme, *Acta Cryst.*, **61**, 1072-1079, doi: 10.1107/S0907444905014356.
13. Egorov, A., Ulyashova, M., and Rubtsova, M. (2020) Impact of key and secondary drug resistance mutations on structure and activity of β-lactamases, in *Antibiotic Drug Resistance* (Martinez, J. C., and G. Igrejas, G., eds.), *Antibiotic Drug Resistance*, John Wiley and Sons, Inc., pp. 121-140.
14. Abriata, L. A., Salverda, M. L. M., and Tomatis, P. E. (2012) Sequence-function-stability relationships in proteins from datasets of functionally annotated variants: the case of TEM β-lactamases, *FEBS Lett.*, **586**, 3330-3335, doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.010.
15. Bush, K. (2013) The ABCD's of β-lactamase nomenclature, *J. Infect. Chemother.*, **19**, 549-559, doi: 10.1007/s10156-013-0640-7.
16. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., and Spencer, J. (2019) β-Lactamases and β-lactamase inhibitors in the 21st century, *J. Mol. Biol.*, **431**, 3472-3500, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
17. Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010) Three decades of β-lactamase inhibitors, *Clin. Microbiol. Rev.*, **23**, 160-201, doi: 10.1128/CMR.00037-09.
18. Liakopoulos, A., Mevius, D., and Ceccarelli, D. (2016) A review of SHV extended-spectrum β-lactamases: neglected yet ubiquitous, *Front. Microbiol.*, **7**, 1374, doi: 10.3389/fmicb.2016.01374.
19. Arpin, C., Labia, R., Andre, C., Frigo, C., El Harrif, Z., and Quentin, C. (2001) SHV-16, a β-lactamase with a pentapeptide duplication in the omega loop, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2480-2485, doi: 10.1128/AAC.45.9.2480-2485.2001.
20. Shcherbinin, D., Veselovsky, A., Rubtsova, M., Grigorenko, V., and Egorov, A. (2020) The impact of long-distance mutations on the Ω-loop conformation in TEM type β-lactamases, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **38**, 2369-2376, doi: 10.1080/07391102.2019.1634642.
21. D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., and Rossolini, G. M. (2013) CTX-M-type β-lactamases: a successful story of antibiotic resistance, *Int. J. Med. Microbiol.*, **303**, 305-317, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008.
22. Bonnet, R. (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1-14, doi: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004.
23. Cantón, R., González-Alba, J. M., and Galán, J. C. (2012) CTX-M enzymes: origin and diffusion, *Front. Microbiol.*, **3**, 110, doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
24. Zhao, W. H., and Hu, Z. Q. (2013) Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β-lactamases in gram-negative bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **39**, 79-101, doi: 10.3109/1040841X.2012.691460.
25. Fursova, N., Pryamchuk, S., Kruglov, A., Abaev, I., Pecherskikh, E., Kartsev, N., Svetoch, E., and Dyatlov, I. (2013) The novel CTX-M-116 β-lactamase gene discovered in *Proteus mirabilis* is composed of parts of the CTX-M-22 and CTX-M-23 genes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 1552-1555, doi: 10.1128/AAC.01471-12.
26. Palzkill, T. (2013) Metallo-β-lactamase structure and function, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1277**, 91-104, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.
27. Malabanan, M. M., Amyes, T. L., and Richard, J. P. (2010) A role for flexible loops in enzyme catalysis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 702-710, doi: 10.1016/j.sbi.2010.09.005.
28. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., and Bartlett, J. (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America, *Clin. Infect. Dis.*, **48**, 1-12, doi: 10.1086/595011.
29. Reading, C., and Cole, M. (1977) Clavulanic acid: a beta-lactamase inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11**, 852-857, doi: 10.1128/AAC.11.5.852.
30. Brown, A. G. (1986) Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor – a case study in drug discovery and development, *Drug Des. Deliv.*, **1**, 1-21.
31. English, A. R., Retsema, J. A., Girard, A. E., Lynch, J. E., and Barth, W. E. (1978) CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 414-419, doi: 10.1128/AAC.14.3.414.
32. Fisher, J., Belasco, J. G., Charnas, R. L., Khosla, S., and Knowles, J. R. (1980) Beta-lactamase inactivation by mechanism-based reagents, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **289**, 309-319, doi: 10.1098/rstb.1980.0048.
33. Payne, D. J., Cramp, R., Winstanley, D. J., and Knowles, D. J. C. (1994) Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important β-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 767-772, doi: 10.1128/AAC.38.4.767.
34. Papp-Wallace, K. M., Bethel, C. R., Barnes, M. D., Rutter, J. D., Taracila, M. A., Bajaksouzian, S., Jacobs, M. R., and Bonomo, R. A. (2017) AAI101, a novel β-lactamase inhibitor: microbiological and enzymatic profiling, *Open Forum Infect. Dis.*, **4**, S375.
35. Manageiro, V., Ferreira, E., Cougnoux, A., Albuquerque, L., Caniça, M., and Bonnet, R. (2012) Characterization of the inhibitor-resistant SHV β-lactamase SHV-107 in a clinical *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing GES-7 enzyme, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 1042-1046, doi: 10.1128/AAC.01444-10.
36. Rodkey, E. A., Drawz, S. M., Sampson, J. M., Bethel, C. R., Bonomo, R. A., and Van Den Akker, F. (2012) Crystal structure of a preacylation complex of the β-lactamase inhibitor sulbactam bound to a sulfenamide bond-containing thiol-β- lactamase, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16798-16804, doi: 10.1021/ja3073676.
37. Van den Akker, F., and Bonomo, R. A. (2018) Exploring additional dimensions of complexity in inhibitor design for serine β-lactamases: mechanistic and intra- and inter-molecular chemistry approaches, *Front. Microbiol.*, **9**, 1-10, doi: 10.3389/fmicb.2018.00622.
38. Grace, M. E., Fu, K. P., Gregory, F. J., and Hung, P. P. (1987) Interaction of clavulanic acid, sulbactam and

cephamycin antibiotics with beta-lactamases, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **13**, 145-148.
39. Docquier, J.-D., and Mangani, S. (2018) An update on β-lactamase inhibitor discovery and development, *Drug Resist. Updat.*, **36**, 13-29, doi: 10.1016/j.drup.2017.11.002.
40. Horita, N., Shibata, Y., Watanabe, H., Namkoong, H., and Kaneko, T. (2017) Comparison of antipseudomonal β-lactams for febrile neutropenia empiric therapy: systematic review and network meta-analysis, *Clin. Microbiol. Infect.*, **23**, 723-729, doi: 10.1016/j.cmi.2017.03.024.
41. Nimmich, E. B., Bookstaver, P. B., Kohn, J., Justo, J. A., Hammer, K. L., Albrecht, H., and Al-Hasan, M. N. (2017) Development of institutional guidelines for management of gram-negative bloodstream infections: incorporating local evidence, *Hosp. Pharm.*, **52**, 691-697, doi: 10.1177/0018578717720506.
42. Zhanel, G. G., Chung, P., Adam, H., Zelenitsky, S., Denisuik, A., Schweizer, F., Lagacé-Wiens, P. R. S., Rubinstein, E., Gin, A. S., Walkty, A., Hoban, D. J., Lynch, J. P., and Karlowsky, J. A. (2014) Ceftolozane/Tazobactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli, *Drugs*, **74**, 31-51, doi: 10.1007/s40265-013-0168-2.
43. Shortridge, D., Duncan, L. R., Pfaller, M. A., and Flamm, R. K. (2019) Activity of ceftolozane-tazobactam and comparators when tested against gram-negative isolates collected from paediatric patients in the USA and Europe between 2012 and 2016 as part of a global surveillance programme, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **53**, 637-643, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.01.015.
44. Walkty, A., Adam, H., Baxter, M., Lagacé-Wiens, P., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., and Zhanel, G. G. (2018) *In vitro* activity of ceftolozane/tazobactam versus antimicrobial non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates including MDR and XDR isolates obtained from across Canada as part of the CANWARD study, 2008-16, *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 703-708, doi: 10.1093/jac/dkx468.
45. Tselepis, L., Langley, G. W., Aboklaish, A. F., Widlake, E., Jackson, D. E., Walsh, T. R., Schofield, C. J., Brem, J., and Tyrrell, J. M. (2020) *In vitro* efficacy of imipenem-relebactam and cefepime-AAI101 against a global collection of ESBL-positive and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **56**, 105925, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105925.
46. Bulik, C. C., and Nicolau, D. P. (2011) Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 3002-3004, doi: 10.1128/AAC.01420-10.
47. De Pascale, G., Martucci, G., Montini, L., Panarello, G., Cutuli, S. L., Di Carlo, D., Di Gravio, V., Di Stefano, R., Capitanio, G., Vallecoccia, M. S., Polidori, P., Spanu, T., Arcadipane, A., and Antonelli, M. (2017) Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case-control study, *Crit. Care*, **21**, 1-10, doi: 10.1186/s13054-017-1769-z.
48. Coleman, K. (2011) Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non-β-lactam β-lactamase inhibitors, *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 550-555, doi: 10.1016/j.mib.2011.07.026.
49. King, D. T., King, A. M., Lal, S. M., Wright, G. D., and Strynadka, N. C. J. (2016) Molecular mechanism of avibactam-mediated β-lactamase inhibition, *ACS Infect. Dis.*, **1**, 175-184, doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00007.
50. Lahiri, S. D., Mangani, S., Jahić, H., Benvenuti, M., Durand-Reville, T. F., De Luca, F., Ehmann, D. E., Rossolini, G. M., Alm, R. A., and Docquier, J. D. (2015) Molecular basis of selective inhibition and slow reversibility of avibactam against class D carbapenemases: a structure-guided study of OXA-24 and OXA-48, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 591-600, doi: 10.1021/cb500703p.
51. Livermore, D. M., Mushtaq, S., Warner, M., Zhang, J., Maharjan, S., Doumith, M., and Woodford, N. (2011) Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 390-394, doi: 10.1128/AAC.00756-10.
52. Levasseur, P., Girard, A. M., Miossec, C., Pace, J., and Coleman, K. (2015) *In vitro* antibacterial activity of the ceftazidime-avibactam combination against Enterobacteriaceae, including strains with well-characterized β-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 1931-1934, doi: 10.1128/AAC.04218-14.
53. Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagacé-Wiens, P. R. S., Denisuik, A., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J., Lynch, J. P., and Karlowsky, J. A. (2013) Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination, *Drugs*, **73**, 159-177, doi: 10.1007/s40265-013-0013-7.
54. Biedenbach, D. J., Kazmierczak, K., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., and Bradford, P. A. (2015) *In vitro* activity of aztreonam-avibactam against a global collection of gram-negative pathogens from 2012 and 2013, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 4239-4248, doi: 10.1128/AAC.00206-15.
55. Livermore, D. M., Warner, M., and Mushtaq, S. (2013) Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 2286-2290, doi: 10.1093/jac/dkt178.
56. Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Landman, D., and Quale, J. (2015) Activity of imipenem with relebactam against gram-negative pathogens from New York City, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 5029-5031, doi: 10.1128/AAC.00830-15.
57. Morinaka, A., Tsutsumi, Y., Yamada, M., Suzuki, K., Watanabe, T., Abe, T., Furuuchi, T., Inamura, S., Sakamaki, Y., Mitsuhashi, N., Ida, T., and Livermore, D. M. (2015) OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine β-lactamase inhibitor, antibiotic and β-lactam "enhancer", *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2779-2786, doi: 10.1093/jac/dkv166.
58. Livermore, D. M., Mushtaq, S., Warner, M., Vickers, A., and Woodford, N. (2017) *In vitro* activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against gram-negative bacteria, *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 1373-1385, doi: 10.1093/jac/dkw593.
59. Durand-Réville, T. F., Guler, S., Comita-Prevoir, J., Chen, B., et al. (2017) ETX2514 is a broad-spectrum β-lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17104, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.104.
60. Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., and Seifert, H. (2004) *In vitro* activities of the β-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1586-1592, doi: 10.1128/AAC.48.5.1586-1592.2004.
61. Hecker, S. J., Reddy, K. R., Totrov, M., Hirst, G. C., Lomovskaya, O., Griffith, D. C., et al. (2015) Discovery of a cyclic boronic acid β-lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases, *J. Med. Chem.*, **58**, 3682-3692, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00127.
62. Lomovskaya, O., Sun, D., Rubio-Aparicio, D., Nelson, K., Tsivkovski, R., Griffith, D. C., and Dudley, M. N. (2017)

Vaborbactam: spectrum of beta-lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in Enterobacteriaceae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, 1-15, doi: 10.1128/AAC.01443-17.
63. Rojas, L. J., Taracila, M. A., Papp-Wallace, K. M., Bethel, C. R., Caselli, E., Romagnoli, C., Winkler, M. L., Spellberg, B., Prati, F., and Bonomo, R. A. (2016) Boronic acid transition state inhibitors active against KPC and other Class A β-lactamases: structure-activity relationships as a guide to inhibitor design, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 1751-1759, doi: 10.1128/AAC.02641-15.
64. Brem, J., Cain, R., Cahill, S., McDonough, M. A., Clifton, I. J., Jiménez-Castellanos, J. C., Avison, M. B., Spencer, J., Fishwick, C. W. G., and Schofield, C. J. (2016) Structural basis of metallo-β-lactamase, serine-β-lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates, *Nat. Commun.*, **7**, 1-8, doi: 10.1038/ncomms12406.
65. Cahill, S. T., Cain, R., Wang, D. Y., Lohans, C. T., Wareham, D. W., Oswin, H. P., Mohammed, J., Spencer, J., Fishwick, C. W. G., McDonough, M. A., Schofield, C. J., and Brema, J. (2017) Cyclic boronates inhibit all classes of β-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, doi: 10.1128/AAC.02260-16.
66. Hamrick, J. C., Docquier, J. D., Uehara, T., Myers, C. L., Six, D. A., et al. (2020) VNRX-5133 (Taniborbactam), a broad-spectrum inhibitor of serine- and metallo-β-lactamases, restores activity of cefepime in enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, doi: 10.1128/AAC.01963-19.
67. Liu, B., Trout, R. E. L., Chu, G. H., Mcgarry, D., Jackson, R. W., et al. (2020) Discovery of taniborbactam (VNRX-5133): a broad-spectrum serine- and metallo-β-lactamase inhibitor for carbapenem-resistant bacterial infections, *J. Med. Chem.*, **63**, 2789-2801, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01518.
68. Tsivkovski, R., Totrov, M., and Lomovskaya, O. (2020) Biochemical characterization of QPX7728, a new ultra-broad-spectrum beta-lactamase inhibitor of serine and metallo-beta-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00130-20, doi: 10.1128/aac.00130-20.
69. Cheng, Z., Thomas, C. A., Joyner, A. R., Kimble, R. L., Sturgill, A. M., et al. (2020) MBlinhibitors.com, a website resource offering information and expertise for the continued development of metallo-β-lactamase inhibitors, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10030459.
70. Ju, L.-C., Cheng, Z., Fast, W., Bonomo, R. A., and Crowder, M. W. (2018) The continuing challenge of metallo-β-lactamase inhibition: mechanism matters, *Trends Pharmacol. Sci.*, **39**, 635-647, doi: 10.1016/j.tips.2018.03.007.
71. Ma, J., McLeod, S., MacCormack, K., Sriram, S., Gao, N., Breeze, A. L., and Hu, J. (2014) Real-time monitoring of New Delhi metallo-β-lactamase activity in living bacterial cells by 1H NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. En Engl.*, **53**, 2130-2133, doi: 10.1002/anie.201308636.
72. Falconer, S. B., Reid-Yu, S. A., King, A. M., Gehrke, S. S., Wang, W., Britten, J. F., Coombes, B. K., Wright, G. D., and Brown, E. D. (2015) Zinc chelation by a small-molecule adjuvant potentiates meropenem activity *in vivo* against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, *ACS Infect. Dis.*, **1**, 533-543, doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00033.
73. King, A. M., Reid-Yu, S. A., Wang, W., King, D. T., De Pascale, G., Strynadka, N. C., Walsh, T. R., Coombes, B. K., and Wright, G. D. (2014) Aspergillomarasmine A overcomes metallo-beta-lactamase antibiotic resistance, *Nature*, **510**, 503-506, doi: 10.1038/nature13445.
74. Bergstrom, A., Katko, A., Adkins, Z., Hill, J., Cheng, Z., et al. (2018) Probing the interaction of aspergillomarasmine A with metallo-β-lactamases NDM-1, VIM-2, and IMP-7, *ACS Infect. Dis.*, **4**, 135-145, doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00106.
75. Somboro, A. M., Tiwari, D., Bester, L. A., Parboosing, R., Chonco, L., Kruger, H. G., Arvidsson, P. I., Govender, T., Naicker, T., and Essack, S. Y. (2015) NOTA: a potent metallo-β-lactamase inhibitor, *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 1594-1596, doi: 10.1093/jac/dku538.
76. Zhang, E., Wang, M.-M., Huang, S.-C., Xu, S.-M., Cui, D.-Y., Bo, Y.-L., Bai, P.-Y., Hua, Y.-G., Xiao, C.-L., and Qin, S. (2018) NOTA analogue: A first dithiocarbamate inhibitor of metallo-β-lactamases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **28**, 214-221, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.074.
77. Abboud, M. I., Kosmopoulou, M., Krismanich, A. P., Johnson, J. W., Hinchliffe, P., Brem, J., Claridge, T. D. W., Spencer, J., Schofield, C. J., and Dmitrienko, G. I. (2018) Cyclobutanone mimics of intermediates in metallo-β-lactamase catalysis, *Chemistry*, 24, 5734-5737, doi: 10.1002/chem.201705886.
78. Büttner, D., Kramer, J. S., Klingler, F. M., Wittmann, S. K., Hartmann, M. R., et al. (2018) Challenges in the development of a thiol-based broad-spectrum inhibitor for metallo-β-lactamases, *ACS Infect. Dis.*, **4**, 360-372, doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00129.
79. Liu, S., Jing, L., Yu, Z.-J., Wu, C., Zheng, Y., Zhang, E., Chen, Q., Yu, Y., Guo, L., Wu, Y., and Li, G.-B. (2018) ((S)-3-Mercapto-2-methylpropanamido)acetic acid derivatives as metallo-β-lactamase inhibitors: synthesis, kinetic and crystallographic studies, *Eur. J. Med. Chem.*, **145**, 649-660, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.032.
80. Klingler, F. M., Wichelhaus, T. A., Frank, D., Cuesta-Bernal, J., El-Delik, J., Müller, H. F., et al. (2015) Approved drugs containing thiols as inhibitors of metallo-β-lactamases: Strategy to combat multidrug-resistant bacteria, *J. Med. Chem.*, **58**, 3626_3630, doi: 10.1021/jm501844d.
81. Brem, J., van Berkel, S. S., Zollman, D., Lee, S. Y., Gileadi, O., McHugh, P. J., Walsh, T. R., McDonough, M. A., and Schofield, C. J. (2016) Structural basis of metallo-β-lactamase inhibition by captopril stereoisomers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 142-150, doi: 10.1128/AAC.01335-15.
82. King, D. T., Worrall, L. J., Gruninger, R., and Strynadka, N. C. J. (2012) New delhi metallo-β-lactamase: structural insights into β-lactam recognition and inhibition, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 11362-11365, doi: 10.1021/ja303579d.
83. Liénard, B. M. R., Garau, G., Horsfall, L., Karsisiotis, A. I., Damblon, C., Lassaux, P., et al. (2008) Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-β-lactamases by thiols, *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 2282-2294, doi: 10.1039/b802311e.
84. Xiang, Y., Chang, Y.-N., Ge, Y., Kang, J.S., Zhang, Y.-L., Liu, X.-L., Oelschlaeger, P., and Yang, K.-W. (2017) Azolylthioacetamides as a potent scaffold for the development of metallo-β-lactamase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 5225-5229, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.038.
85. Hinchliffe, P., Tanner, C. A., Krismanich, A. P., Labbé, G., Goodfellow, V. J., et al. (2018) Structural and kinetic studies of the potent inhibition of metallo-β-lactamases by 6-phosphonomethylpyridine-2-carboxylates, *Biochemistry*, **57**, 1880-1892, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01299.
86. Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Higashi, T., Soga, K., Matsueda, S., Yumoto, H., Misumi, S., Yamagata, Y., Arakawa, Y., and Goto, M. (2005) Irreversible inhibition of metallo-β-lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl)-propionic acid pentafluorophenyl ester, *Angewandte Chemie*, **44**, 3861-3864, doi: 10.1002/anie.200500835.
87. Chiou, J., Wan, S., Chan, K. F., So, P. K., He, D., Chan, E. W. C., Chan, T. H., Wong, K. Y., Tao, J., and Chen, S.

(2015) Ebselen as a potent covalent inhibitor of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM-1), *Chem. Commun.*, **51**, 9543-9546, doi: 10.1039/c5cc02594j.
88. Chen, C., Xiang, Y., Yang, K. W., Zhang, Y., Wang, W. M., Su, J. P., Ge, Y., and Liu, Y. (2018) A protein structure-guided covalent scaffold selectively targets the B1 and B2 subclass metallo-β-lactamases, *Chem. Commun.*, **54**, 4802-4805, doi: 10.1039/c8cc01067f.
89. Wang, R., Lai, T. P., Gao, P., Zhang, H., Ho, P. L., Woo, P. C. Y., Ma, G., Kao, R. Y. T., Li, H., and Sun, H. (2018) Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo-β-lactamase inhibitors, *Nat. Commun.*, **9**, 1-12, doi: 10.1038/s41467-018-02828-6.
90. Papp-Wallace, K. M., Nguyen, N. Q., Jacobs, M. R., Bethel, C. R., Barnes, M. D., et al. (2018) Strategic approaches to overcome resistance against gram-negative pathogens using β-lactamase inhibitors and β-lactam enhancers: activity of three novel diazabicyclooctanes WCK 5153, Zidebactam (WCK 5107), and WCK 4234, *J. Med. Chem.*, **61**, 4067-4086, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00091.
91. Beshnova, D. A., Carolan, C., Grigorenko, V. G., Rubtsova, M. Y., Gbekor, E., Lewis, J., Lamzin, V. S., and Egorov, A. M. (2019) Scaffold hopping computational approach for searching novel β-lactamase inhibitors, *Biomed. Khim.*, **65**, 468-476, doi: 10.18097/pbmc20196506468.
92. Grigorenko, V. G., Andreeva, I. P., Rubtsova, M. Y., Deygen, I. M., Antipin, R. L., et al. (2017) Novel non-β-lactam inhibitor of β-lactamase TEM-171 based on acylated phenoxyaniline, *Biochimie*, **132**, 45-53, doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.011.
93. Antipin, R. L., Beshnova, D. A., Petrov, R. A., Shiryaeva, A. S., Andreeva, I. P., et al. (2017) Synthesis, SAR and molecular docking study of novel non-β-lactam inhibitors of TEM type β-lactamase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 1588-1592, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.02.025.
94. Papaleo, E., Saladino, G., Lambrughi, M., Lindorff-Larsen, K., Gervasio, F. L., and Nussinov, R. (2016) The role of protein loops and linkers in conformational dynamics and allostery, *Chem. Rev.*, **116**, 6391-6423, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00623.
95. Egorov, A., Rubtsova, M., Grigorenko, V., Uporov, I., and Veselovsky, A. (2019) The role of the Ω-loop in regulation of the catalytic activity of TEM-type β-lactamases, *Biomolecules*, **9**, doi: 10.3390/biom9120854.
96. Fast, W., and Sutton, L. D. (2013) Metallo-β-lactamase: inhibitors and reporter substrates, *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 1648-1659, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.024.
97. Payne, D. J., Hueso-Rodríguez, J. A., Boyd, H., Concha, N. O., Janson, C. A., et al. (2002) Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo-β-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1880-1886, doi: 10.1128/AAC.46.6.1880-1886.2002.
98. Sohier, J. S., Laurent, C., Chevigné, A., Pardon, E., Srinivasan, V., et al. (2013) Allosteric inhibition of VIM metallo-β-lactamases by a camelid nanobody, *Biochem. J.*, **450**, 477-486, doi: 10.1042/BJ20121305.
99. Ouyang, X., Chang, Y. N., Yang, K. W., Wang, W. M., Bai, J. J., et al. (2017) A DNA nanoribbon as a potent inhibitor of metallo-β-lactamases, *Chem. Commun.*, **53**, 8878-8881, doi: 10.1039/c7cc04483f.

INHIBITORS OF β-LACTAMASES. NEW LIFE OF β-LACTAM ANTIBIOTICS

Review

A. M. Egorov, M. M. Ulyashova, and M. Yu. Rubtsova*

Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: mrubtsova@gmail.com

Received July 9, 2020
Revised August 14, 2020
Accepted August 15, 2020

β-Lactam antibiotics account for about 60% of all produced antibiotics. Due to a high activity and minimal side effects, they are the most commonly used class of antibacterial drugs for the treatment of various infectious diseases of humans and animals, including severe hospital infections. However, the emergence of bacteria resistant to β-lactams has led to the clinical inefficiency of these antibiotics, and as a result, their use in medicine has been limited. The search for new effective ways for overcoming the resistance to β-lactam antibiotics is an essential task. The major mechanism of bacterial resistance is the synthesis of β-lactamases (BLs) that break the antibiotic β-lactam ring. Here, we review specific inhibitors of serine β-lactamases and metallo-β-lactamases and discuss approaches for creating new inhibitors that would prolong the "life" of β-lactams.

Keywords: antibiotic resistance of bacteria, β-lactamases, inhibitors, β-lactam antibiotics

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1540 – 1549

УДК 577.18

ИНГИБИРОВАНИЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ ПУТЕМ CRISPR/Cas9-SAM ОПОСРЕДОВАННОГО УСИЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩИХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HeLa

© 2020 П.А. Бобровский[1]*, В.Д. Мороз[1], В.Н. Лавренова[1,2], В.А. Манувера[1], В.Н. Лазарев[1]

[1] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России 119435 Москва, Россия; электронная почта: pbobrovskiy@gmail.com*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 07.07.2020
После доработки 22.08.2020
Принята к публикации 23.08.2020

Глобальная проблема роста антибиотикорезистентности микроорганизмов делает актуальным поиск новых природных веществ, обладающих антибактериальными свойствами. К данной группе относят пептидогликан-распознающие белки (PGLYRP), являющиеся компонентами врожденного иммунитета многих организмов, в том числе и человека. Эти белки обладают уникальным механизмом действия, позволяющим избегать формирования резистентности к ним бактерий, а также быть активными как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий. Однако применение рекомбинантных пептидогликан-распознающих белков не всегда целесообразно из-за сложности локальной доставки белков и их стабильности, в связи с этим представляется актуальным активация компонентов собственного врожденного иммунитета. Целью данного исследования было увеличить уровень экспрессии собственных генов пептидогликан-распознающих белков человека в клетках линии HeLa с помощью технологии редактирования генома, используя синергичные медиаторы активации (CRISPR/Cas9-SAM), чтобы оценить антихламидийный эффект PGLYRP. Мы показали активацию генов двухкомпонентной системы хламидий *ctcB-ctcC*, играющей ключевую роль в механизме действия пептидогликан-распознающих белков. Нами были получены клетки линии HeLa, трансдуцированные лентивирусами, кодирующими активационную систему CRISPR/Cas9-SAM с повышенной экспрессией генов *pglyrp*. Мы показали, что активация экспрессии генов собственных пептидогликан-распознающих белков человека в линии клеток HeLa приводит к ингибированию развития хламидийной инфекции. Предложенный подход позволяет использовать возможности врожденного иммунитета для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми грамположительными и грамотрицательными бактериями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пептидогликан, *Chlamydia trachomatis*, PGLYRP, CRISPR/Cas9.

DOI: 10.31857/S0320972520110032

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день рост количества антибиотикорезистентных штаммов является глобальной проблемой. Возникновение резистентных штаммов приводит к снижению эффективности терапии социально-значимых инфекционных заболеваний. Заболевания, вызываемые резистентными штаммами, труднее поддаются лечению и часто протекают в более тяжелой форме [1]. Описаны серьезные побочные эффекты применения некоторых антибиотиков [2, 3]. В этой связи становится актуальным поиск новых природных веществ, обладающих бактерицидными свойствами. Перспективными кандидатами являются пептидогликан-распознающие белки (PGLYRP, peptidoglycan recognition proteins), обнаруженные у многих организмов от насекомых до млекопитающих. Эти белки являются компонентами системы врожденного иммунитета, выполняющей роль первого барьера

Принятые сокращения: CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; dCas9 – дефектная нуклеаза Cas9; DMEM – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; HSF1 – фактор теплового шока; PEI – полиэтиленимин; PGLYRP – пептидогликан-распознающие белки; p65 – субъединица транскрипционного фактора NF-κB; SAM – синергичные медиаторы активации.

* Адресат для корреспонденции.

иммунной защиты организма [4]. Все PGLYRP содержат пептидогликан-распознающие домены, связывающие пептидогликан в пептидогликан-связывающей бороздке, открывающейся при клеточном делении [5]. Также они содержат сайты связывания с липополисахаридами и липотейхоевыми кислотами [6, 7]. Таким образом, PGLYRP способны узнавать пептидогликан, липополисахариды и липотейхоевые кислоты клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий [7]. У млекопитающих описано четыре PGLYRP: PGLYRP1, PGLYRP3, PGLYRP4, которые были идентифицированы как бактерицидные белки, и PGLYRP2, который дополнительно обладает амидазной активностью. В 2011 г. был предложен механизм действия этих белков. PGLYRP связываются с пептидогликаном бактериальной клеточной стенки или липополисахаридами наружных мембран и активируют белок-чувствительную двухкомпонентную систему [5]. Бактерии имеют множество двухкомпонентных систем, которые состоят из сенсорных и регуляторных компонентов и позволяют бактериям быстро реагировать на изменяющиеся условия окружающей среды. Двухкомпонентные системы CssR-CssS у *Bacillus subtilis* и CpxA-CpxR у *Escherichia coli* являются функциональными гомологами, и аналогичные двухкомпонентные системы характерны для большинства бактерий [8, 9]. Эти двухкомпонентные системы обнаруживают и элиминируют секретируемые и мембранные белки с неправильной структурой, причем они реагируют как на собственные, так и на чужеродные белки, независимо от причины накопления белка в примембранном компартменте [10, 11]. Помимо этого, они также могут подавать сигнал в клетку для активации продукции гидроксильных радикалов, деполяризации мембраны, прекращения синтеза белов, РНК и ДНК, что приводит к гибели бактериальной клетки [12]. Поскольку эти белки являются частью системы врожденного иммунитета человека, высокая бактерицидная активность по отношению к патогенным микроорганизмам и устойчивость собственной микрофлоры [13] являются неоспоримыми преимуществами по сравнению с антибиотиками. Особый интерес представляет активность PGLYRP по отношению к внутриклеточным паразитам, таким как, например *Chlamydia*, которая является патогенной грамотрицательной бактерией с уникальным жизненным циклом. Хламидии вызывают серьезные патологии беременности и родов, непроходимость маточных труб и офтальмохламидиоз [14, 15]. Хламидии существуют в организме в двух формах: инфекционные, метаболически неактивные элементарные тельца, и неинфекционные, метаболически активные ретикулярные тельца [16]. Уникальные особенности взаимоотношений хламидий с иммунной системой человека часто способствуют развитию персистирующей формы инфекции [17]. Ранее мы продемонстрировали антибактериальную активность рекомбинантных PGLYRP человека в отношении внутриклеточной патогенной бактерии *Chlamydia trachomatis* и активацию экспрессии генов двухкомпонентной системы CtcB-CtcC после контакта хламидийных элементарных телец с PGLYRP [18]. Альтернативой применения рекомбинантных антимикробных белков, полученных в гетерологичных системах экспрессии, является использование различных генотерапевтических подходов. Одним из способов борьбы с инфекционными заболеваниями с помощью генной терапии является введение генетических конструкций, кодирующих различные компоненты врожденного иммунитета, например антимикробные пептиды [19–21], или активация экспрессии белков врожденного иммунитета [22]. В данной работе с использованием технологии геномного редактирования, применяя синергичные медиаторы активации (SAM, Synergistic Activation Mediator), мы смоделировали ингибирование развития хламидийной инфекции путем увеличения уровня экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков в клетках линии HeLa. Полученные данные демонстрируют, что данный подход может являться многообещающим инструментом для специфической и целевой активации компонентов врожденного иммунитета для борьбы с тяжелыми инфекционными заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и клеточные линии. В работе использовали штамм *E. coli* TOP10 («Invitrogen», США), генотип F – mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ-, элементарные тельца штамма *C. trachomatis* D/UW-3/Cx (ATCC VR-885) («ATCC», США), очищенные путем ультрацентрифугирования в градиенте урографина, как описано ранее [23].

В работе использовали клеточные линии HeLa («ATCC CCL-2», США) и HEK-293FT («Thermo Fisher Scientific», США). Клетки HeLa культивировали в среде DMEM («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 10%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) («Thermo Fisher Scientific», США) и

Список олигонуклеотидов, использованных в работе

Праймеры для клонирования протоспейсеров	Последовательность праймеров (5'–3')
pglyrp1-1F	caccgagaagatgtgccaatgcccc
pglyrp1-2F	caccgaacttacatcgcagaggcc
pglyrp2-1F	caccgagaagagactgggggagacc
pglyrp2-2F	caccgtctgaaccacctggtctcc
pglyrp3-1F	caccgattagtgccctcacatttat
pglyrp3-2F	caccggccccgagaagcctgagcc
pglyrp4-1F	caccgctggaggagaaggcgccagt
pglyrp4-2F	caccgggcactccctccctgggaa
pglyrp1-1R	aaacggggcattggcacatcttctc
pglyrp1-2R	aaacggcctctgcgatgtaagttcc
pglyrp2-1R	aaacggtctcccccagtctcttctc
pglyrp2-2R	aaacggagaccaggtggttcagacc
pglyrp3-1R	aaacataaatgtgagggcactaatc
pglyrp3-2R	aaacggctcaggcttctcggggccc
pglyrp4-1R	aaacactggcgccttctcctccagc
pglyrp4-2R	aaacttcccagggagggagtgcccc
Праймеры для количественной ПЦР	
pglyrp 1qF1	gccctgaggtccaactatgt
pglyrp 1qR1	cggtagtgtggccaattctg
pglyrp 2qF1	cctgctcatggactctgtca
pglyrp 2qR1	cttagtgggcagggatccaa
pglyrp 3qF1	tgccctaggaattgccttca
pglyrp 3qR1	gcccatcagcaggtagtttg
pglyrp 4qF1	tgactcccaactacctgctg
pglyrp 4qR1	tgagccaagctggatggtta
ctcbF	tctcacgacttcctcttcct
ctcbR	caggatctatagagcgctgt
ctccF	caagcgctacaacaagaca
ctccR	tggcttgcaaatggatcgga
euoF	gcagcaagaagagaatgctg
euoR	tgcgctcagcttccttct
omcbF	tgcaacagtatgcgcttgtc
omcbR	aagaccaatctgctcctgca
actbF	agagctacgagctgcctgac
actbR	agcactgtgttggcgtacag

10 мкг/мл гентамицина («Thermo Fisher Scientific», США). При моделировании хламидийной инфекции клетки HeLa культивировали до достижения монослоем 80–90% конфлюентности с использованием среды без антибиотиков. Клетки заражали элементарными тельцами *C. trachomatis* с множественностью инфекции 0,9–1,0 ВОЕ (включение образующих единиц) на клетку центрифугированием в течение 1 ч при 900 g. После центрифугирования клетки культивировали в термостате при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Для продукции PGLYRP клетки-продуценты HeLa-PGLYRP, полученные нами ранее [18], культивировали в среде DMEM с 10 мкг/мл гентамицина и без ЭТС в течение 72 ч.

Количественная ПЦР. Выделение РНК из образцов проводили реагентом Trizol («Thermo Fisher Scientific», США). Суммарную РНК обрабатывали 2 е.а. ДНКазы I («Thermo Fisher Scientific», США) в присутствии 20 е.а. ингибитора рибонуклеаз («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью RevertAid RT Reverse Transcription Kit («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием гексамерных праймеров. Последовательности праймеров («Литех», Россия), использованных в работе, представлены в таблице. ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 Touch («BioRad», США) с использованием Taq-полимеразы («Литех», Россия) и 0,1× SYBR-Green («Thermo Fisher Scientific», США). Количество РНК, соответствующей целевым и референсным генам, определяли по разности порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца. Для определения уровня экспрессии *pglyrp1–pglyrp4* использовали специфические праймеры. Нормализацию данных проводили по уровню референсного гена β-актина (использовали пару праймеров actbF/actbR). Для определения уровня активации двухкопонентной системы хламидий использовали пары праймеров ctcbF/ctcbR и ctccF/ctccR. Данные были нормированы по уровню генов *euo* и *omcB* (использовали пары праймеров euoF/euoR и omcbF/omcbR) (таблица).

Конструирование плазмидных векторов для активации экспрессии генов PGLYRP. Система активации экспрессии SAM включает в себя три плазмидных вектора: lenti sgRNA(MS2)_puro, lenti MS2-P65-HSF1_Hygro и lenti dCAS-VP64_Blast («Addgene», США) [24]. Для получения вектора, кодирующего химерную гидовую РНК, вектор lenti sgRNA(MS2)_puro был обработан эндонуклеазой рестрикции BsmBI («Thermo Fisher Scientific», США), после чего были клонированы олигонуклеотидные дуплексы, соответствующие протоспейсерным последовательностям, расположенных в промоторных областях пептидогликан-распознающих белков (таблица). Подбор протоспейсерных

последовательностей проводили с помощью сервиса crispor по наличию специфических PAM-последовательностей в промоторных регионах [25].

Продукция лентивирусов и трансдукция. Для сборки лентивирусов клеткам HEK-293FT меняли среду на DMEM с 25 мкМ хлорохин дифосфата («Sigma», США) и инкубировали в течение 5 ч. Клетки, культивированные в матрасах площадью 225 см^2, трансфицировали одновременно четырьмя плазмидами с помощью полиэтиленимина (PEI): PEIMAX 40K (1мг/мл) («Polysciences», США) (соотношение ДНК/PEI = 1/3), согласно описанной ранее методике [26]. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь ДНК/PEI по каплям добавляли к клеткам и инкубировали в течение 6 ч. Затем среду меняли на OptiMEM с 2 мМ бутиратом натрия («Sigma», США). Через 48 ч среду, содержащую лентивирусы, концентрировали на колонках Amicon 30 кДа («Merk», США) до уменьшения объема в 50 раз, после чего замораживали при –70 °С.

Сконцентрированные вирусные частицы добавляли к клеткам HeLa в среду DMEM, содержащую 50 мкг/мл протамина сульфата («Эллара», Россия). Клетки инкубировали в течение 6 ч. Далее среду меняли на DMEM с соответствующим антибиотиком и культивировали клетки при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 до момента гибели всех нетрансдуцированных клеток.

Получение трансдуцированных линий с активированной экспрессией PGLYRP. Для получения трансдуцированных линий с активированной экспрессией собственных PGLYRP проводили последовательную трансдукцию тремя лентивирусами с промежуточной селекцией. Для селекции клеток HeLa, трансдуцированных лентивирусом dCAS-VP64_Blast, использовали бластицидин (3 мкг/мл). Для селекции клеток HeLa, трансдуцированных MS2-P65-HSF1_Hygro, использовали бластицидин и гигромицин (3 мкг/мл и 550 мкг/мл соответственно). Полученную клеточную линию назвали HeLa-dCas9-MS2. Для селекции клеток HeLa, трансдуцированных лентивирусом sgRNA(MS2)_puro-PGLYRP1-4, использовали бластицидин, гигромицин и пуромицин (3 мкг/мл, 550 мкг/мл и 0,5 мкг/мл соответственно). Для анализа антихламидийной активности культуральную среду меняли на DMEM без антибиотиков.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки, инфицированные *C. trachomatis*, окрашивали антителами РекомбиСлайд («Галарт Диагностикум», Россия) по описанной ранее методике [18] через 48 ч после заражения. Степень заражения определяли количественно путем подсчета количества клеток и включений с использованием флуоресцентной микроскопии не менее чем в 10 полях зрения в трех повторах. Изображения были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse E800 («Nikon», Япония) с аргоновым (488 нм) и гелий-неоновым (594 нм) лазерами. Изображения получали с помощью программного обеспечения EZ-C1 («Nikon», Япония), а анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ 1.48 [27]. Для определения антихламидийной активности PGLYRP определяли количество включений в клетках, синтезирующих PGLYRP относительно немодифицированных клеток HeLa.

Статистический анализ данных. Для количественного анализа экспрессии генов *pglyrp* использовали метод Pfaffl [28]. Для количественного анализа экспрессии генов двухкомпонентной системы использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ [29]. Анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и теста множественных сравнений (двухсторонний дисперсионный анализ) с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 («StatSoft», Россия). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Различия между средними значениями считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Модификация клеток HeLa с использованием технологии CRISPR/Cas9-SAM для транскрипционной активации генов *pglyrp*. Для каждого гена *pglyrp* было подобрано по две протоспейсерных последовательности в области промоторов. В результате было сконструировано 8 плазмидных векторов, кодирующих гидовые РНК для распознавания промоторных областей генов *pglyrp*. Эти векторы были использованы для получения лентивирусов и трансдукции клеток HeLa-dCas9-MS2. Эти клетки синтезируют дефектную нуклеазу Cas9, не способную вносить разрывы в цепь ДНК после связывания с гидовой РНК, слитую с тетрамером VP16 для активации транскрипции, а также химерный белок фага MS2, слитый с активационным доменом фактора теплового шока 1 (HSF1), и субъединицы p65 фактора транскрипции NF-κB для привлечения транскрипционных факторов. Для определения транскрипционной активации генов *pglyrp* была выделена суммарная РНК, получена кДНК с использованием гексамерных праймеров, после чего была проведена ПЦР в режиме реального времени. Было показано, что в клетках, трансдуцированных лентивирусами, кодирущими гидовые РНК с протоспейсерными

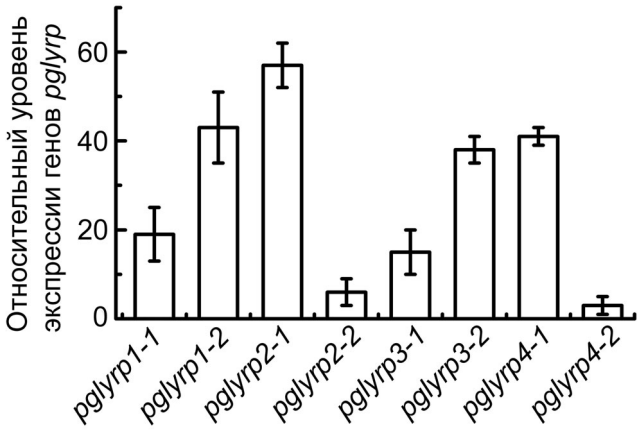


Рис. 1. Относительное изменение уровня экспрессии генов *pglyrp* в трансдуцированной линии клеток HeLa лентивирусами, кодирующими компоненты активационной системы CRISPR/Cas9-SAM. Для каждого гена *pglyrp* было подобрано по два протоспейсера для конструирования гидовой РНК. На гистограмме столбцы соответствуют разным протоспейсерным последовательностям гидовых РНК

последовательностями *pglyrp1-2*, *pglyrp2-1*, *pglyrp3-1* и *pglyrp4-1*, относительный уровень экспрессии целевых генов составил 43,2 ± 8,1, 57,0 ± 5,2, 38,5 ± 3,1 и 41,8 ± 2,6 соответственно (рис. 1). Для дальнейшей работы были использованы трансдуцированные клетки с наибольшим уровнем экспрессии.

Анализ активации двухкомпонентной системы *C. trachomatis*. Для изучения активации экспрессии генов двухкомпонентной системы CtcB-CtcC хламидий в ответ на PGLYRP мы использовали стабильные линии клеток-продуцентов рекомбинантных PGLYRP, полученных нами ранее [18]. Мы выделили суммарную РНК из клеток, инфицированных *C. trachomatis*, через 30, 60, 90, 120, 180 и 300 мин после заражения. С помощью ПЦР в режиме реального времени была показана активация экспрессии генов двухкомпонентной системы хламидий (*ctcB* и *ctcC*) после инфицирования клеточных линий-продуцентов рекомбинантных PGLYRP. Уровни мРНК *ctcB-ctcC* сравнивали с исходным количеством мРНК этих генов в интактных элементарных тельцах. Мы показали, что инкубация хламидийных элементарных телец в культуральной среде с рекомбинантными PGLYRP приводила к значительному увеличению уровня мРНК генов *ctcB* и *ctcC* (рис. 2).

Максимальные уровни мРНК наблюдали через 2 ч после контакта элементарных телец с

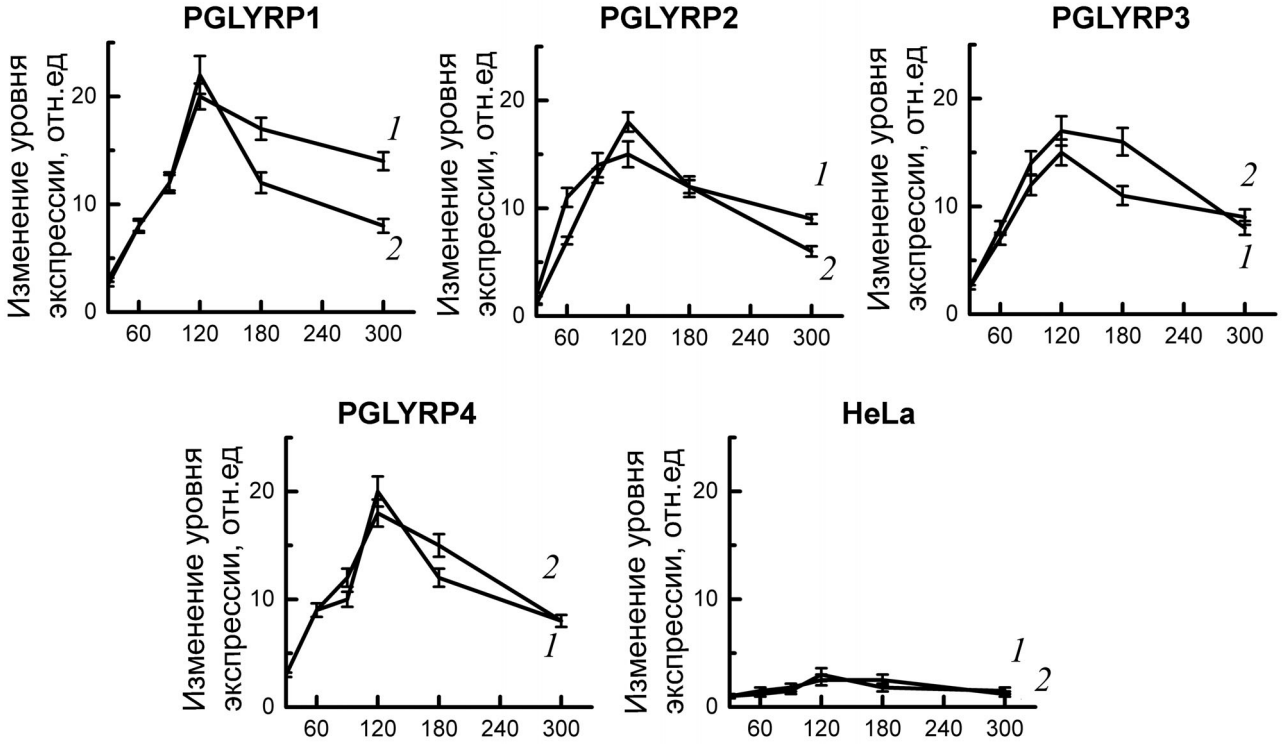


Рис. 2. Анализ активации двухкомонентой системы CtcB-CtcC *C. trachomatis* после взаимодействия с рекомбинантными PGLYRP. Суммарную РНК выделяли из клеток через 30, 60, 90, 120, 180 и 300 мин после заражения. Данные ПЦР в режиме реального времени нормировали по уровню генов *euo* и *omcB*. Данные представлены как изменение уровня экспрессии, рассчитанные по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$. Изменение уровня экспрессии генов *ctcB* (линия *1*) и *ctcC* (линия *2*) оценивали относительно уровня РНК в интактных элементарных тельцах, не контактировавших с PGLYRP

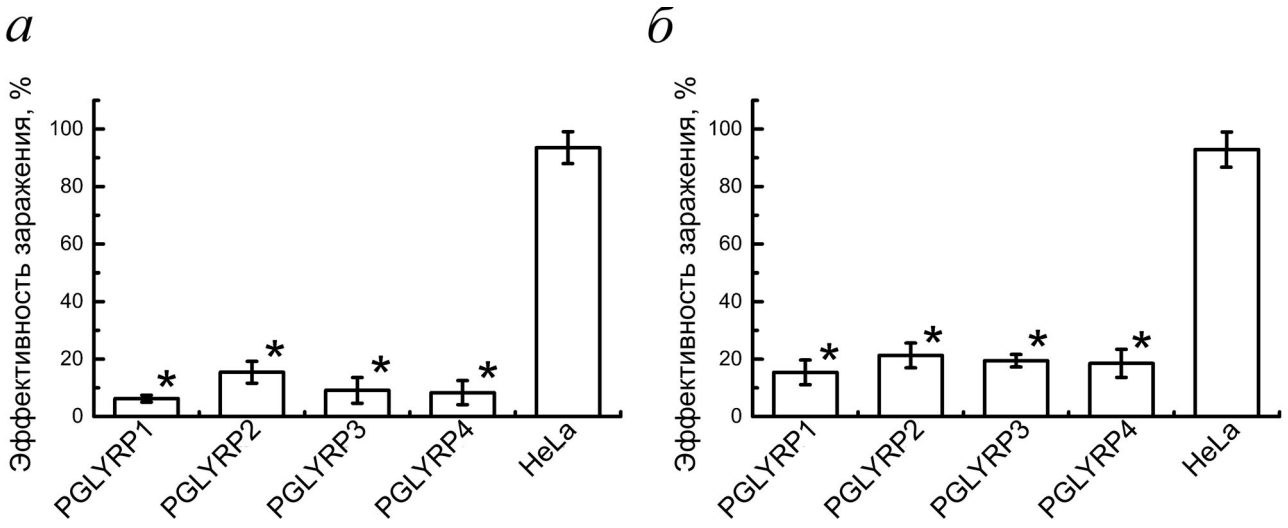


Рис. 3. Определение антихламидийной активности PGLYRP. *а* – Гистограмма, показывающая эффективность заражения клеток HeLa – продуцентов рекомбинантных PGLYRP. *б* – Гистограмма, показывающая эффективность заражения трансдуцированных клеток HeLa с активированной экспрессией генов собственных PGLYRP с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9-SAM (* $p < 0,05$)

PGLYRP. Экспрессия гена *ctcB* увеличилась в 15–20 раз, а *ctcC* – в 15–22 раза от исходного количества мРНК в хламидийных элементарных тельцах. После добавления элементарных телец в среду к контрольным клеткам HeLa уровни мРНК существенно не отличались от исходного количества мРНК *ctcB-ctcC* в элементарных тельцах.

Антихламидийная активность PGLYRP. Для определения антихламидийной активности PGLYRP мы подсчитали количество включений *C. trachomatis*, образующихся в клетках стабильных линий HeLa, продуцирующих рекомбинантные PGLYRP, и в трансдуцированных клетках линии HeLa с активированной экспрессией генов *pglyrp* через 48 ч после добавления элементарных телец в среду, содержащую PGLYRP. Была определена эффективность заражения ((количество включений/общее количество клеток) × × 100%). Эффективность заражения клеток-продуцентов рекомбинантных PGLYRP, инфицированных *C. trachomatis* составляла 6,2 ± 1,0%, 15,4 ± 2,9%, 9,1 ± 3,3% и 8,3 ± 4,0% для PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 и PGLYRP4 соответственно, в то время как для контрольных клеток эффективность заражения составляла 93,5 ± 6,2% (рис. 3, *а*). Через 48 ч после заражения элементарными тельцами пулов трансдуцированных клеток HeLa-PGLYRP эффективность заражения составила 15,4 ± 3,2%, 21,3 ± ± 3,2%, 19,4 ± 1,8% и 18,5±3,7% для клеток-продуцентов PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 и PGLYRP4 соответственно. Эффективность заражения контрольных клеток составила 92,9 ± ± 6,9% (рис. 3, *б*). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка.

Таким образом, мы показали, что активация экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков человека в линии клеток HeLa приводит к ингибированию развития хламидийной инфекции в условиях *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кожа и слизистые оболочки защищают организм от проникновения патогенной микрофлоры. Эти ткани образуют не только механический барьер, но также синтезируют и секретируют различные антимикробные пептиды и белки [30, 31]. Антимикробные белки и пептиды считаются наиболее перспективными противоинфекционными агентами, поскольку они вызывают меньше побочных эффектов по сравнению с антибиотиками [32], и развитие резистентности к ним затруднено в силу специфического механизма действия [33]. Одним из направлений поиска новых антимикробных препаратов, как альтернативы антибиотикам, является исследование врожденных систем защиты организма. Пептидогликан-распознающие белки представляют собой класс бактерицидных белков системы врожденного иммунитета. Эти белки активны против патогенных грамотрицательных и грамположительных бактерий *in vivo* и *in vitro* [12, 34] и обладают уникальным механизмом действия. Он заключается в том, что PGLYRP связываются с пептидогликаном клеточной

стенки бактерии во время деления и активируют бактериальную двухкомпонентную систему ответа на стресс, в результате чего происходит индукция деполяризации мембраны и продукции гидроксил-радикалов в цитоплазме [12]. Этот процесс сопровождается прекращением всех основных внутриклеточных биосинтетических реакций, вероятно, из-за нехватки энергии, зависящей от мембранного потенциала [35]. Двухкомпонентные белок-чувствительные системы, которые играют роль в этом механизме действия, предназначены для обнаружения и утилизации бактериальных белков с неправильной структурой, которые не смогли выйти в периплазматическое пространство или экспортироваться из клетки, застряв в мембране [8, 9]. Связывание PGLYRP с пептидогликаном вызывает изменение в PGLYRP, что блокирует пептидогликан в пептидогликан-связывающей бороздке и делает связывание необратимым [36]. PGLYRP также имеют гидрофобную часть на противоположной стороне от пептидогликан-связывающей бороздки, в результате чего эти белки распознаются как белки с неправильной структурой, которые обычно имеют открытые гидрофобные участки, либо как агрегированные белки, поскольку неправильно свернутые белки часто агрегируют и связываются с пептидогликаном [37]. Особенность механизма действия PGLYRP заключается в том, что PGLYRP убивает бактерии, одновременно вызывая у них окислительный, тиол-дисульфидный и металлический стресс. Окислительный стресс, индуцированный PGLYRP, возникает из-за повышенной выработки перекиси водорода и гидроксильных радикалов [5, 38, 39].Тиол-дисульфидный стресс возникает из-за истощения пула внутриклеточных тиолов, в особенности глутатиона (более чем на 90%), а металлический стресс возникает в связи с увеличением внутриклеточной концентрации ионов Zn^{2+} и Cu^{2+} [38, 39]. Для бактерицидного эффекта требуется индукция всех трех стрессовых реакций. Каждая реакция на стресс в отдельности является только бактериостатической, и только комбинированная индукция всех трех событий является бактерицидной [39]. Устойчивость к PGLYRP могла бы возникнуть, если бы все три реакции на стресс (т.е. на окислительный, тиоловый и металлический стресс) индуцировались PGLYRP через один сигнальный путь. Однако PGLYRP индуцирует окислительный, тиоловый и металлический стресс тремя независимыми путями [38]. При этом каждый PGLYRP обладает разным спектром бактерицидной активности [34]. По всей видимости, бактерии нормальной флоры выработали устойчивость к бактерицидным белкам в органах и тканях, где постоянно секретируются PGLYRP (например, в коже, глазах и слизистых оболочках секретируются PGLYRP3 и PGLYRP4), и могут колонизировать эти области. Бактериостатическое действие PGLYRP на бактерии нормальной флоры имеет физиологический смысл для хозяина – бактерии нормальной флоры не погибают, но их разрастание ограничено [13].

Пептидогликан является основным компонентом клеточных стенок бактерий и мишенью для некоторых антибактериальных препаратов. Ранее считалось, что у хламидий нет пептидогликана, хотя в геноме присутствуют все компоненты для его биосинтеза [40, 41], в связи с этим влияние PGLYRP на хламидии не исследовалось. В 2014 г. было показано наличие пептидогликана у хламидий [42]. Также у хламидий присутствует двухкомпонентная система (CtcB-CtcC) [43], которая может принимать участие в механизме действия PGLYRP. Хламидии являются облигатными внутриклеточными грамотрицательными бактериями, способными обходить механизмы иммунной защиты и сохраняющими жизнеспособность в клетках в течение длительного периода времени [44]. Ранее мы впервые показали антихламидийную активность выделенных и очищенных рекомбинантных пептидогликан-распознающих белков, полученных в клетках человека Expi293, определили минимальные подавляющие концентрации [18] и оценили уровень накопления белков в линиях-продуцентах [45]. В этой работе мы оценили антихламидийный эффект стабильных линий клеток HeLa, которые секретируют рекомбинантные человеческие PGLYRP1, PGLYRP2, PGLYRP3 и PGLYRP4. Мы показали, что при заражении линий-продуцентов рекомбинатных PGLYRP количество идентифицируемых хламидийных включений внутри клеток ниже, чем при заражении контрольных клеток (рис. 3, *а*).

Мы показали, что контакт PGLYRP с элементарными тельцами *C. trachomatis* способствует увеличению уровня экспрессии генов двухкомпонентной системы, что может приводить к ингибированию хламидийной инфекции (рис. 2). При этом максимальное количество мРНК генов двухкомпонентной системы наблюдается через 2 ч после контакта с раствором рекомбинантного белка. Для некоторых бактериальных двухкомпонентных систем описан механизм аутоактивации, который может объяснить чрезмерную индукцию реакции на стресс [46]. Таким образом, вероятно, механизм действия PGLYRP на хламидии схож с действием этих белков на другие бактерии.

Существуют ограничения на использование рекомбинантных белков для терапии инфекци-

онных заболеваний. Это низкая стабильность некоторых выделенных рекомбинантных белков [47], а также ограниченная возможность локального применения [48]. Альтернативным вариантом применения рекомбинантных белков могут служить генотерапевтические подходы путем активации собственных генов системы врожденного иммунитета для борьбы с инфекцией [49]. Генная терапия инфекционных заболеваний имеет значительный потенциал для лечения инфекций, которые не поддаются стандартному клиническому лечению [50–54]. При этом одним из способов терапии является индукция врожденного иммунитета, например через активацию сигнальных путей Toll-подобных рецепторов [55, 56].

Для определения антихламидийной активности PGLYRP человека мы повысили уровень экспрессии генов *pglyrp* в клетках линии HeLa с помощью системы CRISPR/Cas9-SAM. Система синергичных медиаторов активации состоит из трех компонентов: специфичная химерная гидовая РНК, имеющая два аптамера MS2 для связывания с димеризованными белками оболочки бактериофага MS2; белки MS2 с различными активаторами, такими как активационный домен p65 транскрипционного фактора NF-κB и активационный домен белка теплового шока HSF1, которые привлекают факторы транскрипции вокруг промотора гена-мишени; и дефектная нуклеаза dCas9-VP64, которая слита с тетрамером VP16, являющимся активатором транскрипции. Такая система позволяет существенно увеличивать экспрессию целевых генов [57].

Клетки HeLa после трансдукции лентивирусами, кодирующими активационную систему CRISPR/Cas9-SAM продемонстрировали повышенный уровень экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков (рис. 1), а также присутствие белков в культуральной среде (данные не представлены). Мы показали, что в клетках, в которых активирована экспрессия генов пептидогликан-распознающих белков, на 79,5–85% снижается эффективность заражения клеток хламидиями по сравнению с контролем (рис. 3, *б*).

Применение антибиотиков приводит к образованию резистентных штаммов. Одним из направлений решения проблемы устойчивости бактерий к используемым препаратам может служить применение белков врожденного иммунитета, к которым затруднено развитие резистентности в связи со специфическими механизмами действия данных белков. Несмотря на то что применение рекомбинантных белков врожденного иммунитета, полученных в гетеро- и гомологичных системах экспрессии, выгодно за счет отсутствия токсических эффектов, использование их ограничено из-за трудности локального применения. В этой работе описывается подход, позволяющий решить этот недостаток терапевтического использования белков врожденного иммунитета путем активации экспрессии генов пептидогликан-распознающих белков в эукариотических клетках. Предложенный подход позволяет использовать ресурсы врожденного иммунитета для борьбы с инфекциями, в том числе и с теми, которые вызываются антибиотико-резистентными штаммами.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00270).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prestinaci, F., Pezzotti, P., and Pantosti, A. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon, *Pathog. Glob. Health*, **109**, 309-318, doi: 10.1179/2047773215y.0000000030.
2. Grill, M. F., and Maganti, R. K. (2011) Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **72**, 381-393, doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03991.x.
3. Roberts, M. C. (2002) Antibiotic toxicity, interactions and resistance development, *Periodontol. 2000*, **28**, 280-297, doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280112.x.
4. Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001) Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules, *J. Biol. Chem.*, **276**, 34686-34694, doi: 10.1074/jbc.M105566200.
5. Kashyap, D. R., Wang, M., Liu, L. H., Boons, G. J., Gupta, D., and Dziarski, R. (2011) Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems, *Nat. Med.*, **17**, 676-683, doi: 10.1038/nm.2357.
6. Sharma, P., Dube, D., Singh, A., Mishra, B., Singh, N., et al. (2011) Structural basis of recognition of pathogen-associated molecular patterns and inhibition of proinflammatory cytokines by camel peptidoglycan recognition protein, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16208-16217, doi: 10.1074/jbc.M111.228163.
7. Tydell, C. C., Yuan, J., Tran, P., and Selsted, M. E. (2006) Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties., *J. Immunol.*, **176**, 1154-1162, doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1154.
8. Hyyryläinen, H. L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., Sarvas, M., Prágai, Z., Bron, S., van Dijl, J. M., and Kontinen, V. P. (2001) A novel two-component regulatory system in

Bacillus subtilis for the survival of severe secretion stress, *Mol. Microbiol.*, **41**, 1159-1172, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02576.x.
9. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., and Collins, J. J. (2008) Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death, *Cell*, **135**, 679-690, doi: 10.1016/j.cell.2008.09.038.
10. Darmon, E., Noone, D., Masson, A., Bron, S., Kuipers, O. P., Devine, K. M., and van Dijl, J. M. (2002) A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated CssRS two-component system of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **184**, 5661-5671, doi: 10.1128/jb.184.20.5661-5671.2002.
11. Westers, H., Westers, L., Darmon, E., van Dijl, J. M., Quax, W. J., and Zanen, G. (2006) The CssRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*, *FEBS J.*, **273**, 3816-3827, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05389.x.
12. Dziarski, R., Kashyap, D. R., and Gupta, D. (2012) Mammalian peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating two-component systems and modulate microbiome and inflammation., *Microb. Drug Res.*, **18**, 280-285, doi: 10.1089/mdr.2012.0002.
13. Dziarski, R., and Gupta, D. (2006) Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins, *Cell. Microbiol.*, **8**, 1059-1069, doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00726.x.
14. O'Connell, C. M., and Ferone, M. E. (2016) *Chlamydia trachomatis* genital infections, *Microb. Cell*, **3**, 390-403, doi: 10.15698/mic2016.09.525.
15. Kalayoglu, M. V. (2002) Ocular chlamydial infections: pathogenesis and emerging treatment strategies, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **2**, 85-91, doi: 10.2174/1568005024605918.
16. Moulder, J. W. (1991) Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*, *Microb. Rev.*, **55**, 143-190.
17. Panzetta, M. E., Valdivia, R. H., and Saka, H. A. (2018) *Chlamydia* persistence: a survival strategy to evade antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*, *Front. Microbiol.*, **9**, 3101, doi: 10.3389/fmicb.2018.03101.
18. Bobrovsky, P., Manuvera, V., Polina, N., Podgorny, O., Prusakov, K., Govorun, V., and Lazarev, V. (2016) Recombinant human peptidoglycan recognition proteins reveal antichlamydial activity, *Infect. Immun.*, **84**, doi: 10.1128/IAI.01495-15.
19. Zhu, M., Miao, B., Zhu, J., Wang, H., and Zhou, Z. (2017) Expression and antimicrobial character of cells transfected with human β-defensin-3 against periodontitis-associated microbiota *in vitro*, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 2455-2460, doi: 10.3892/mmr.2017.6913.
20. Zhang, J., Xie, L., Xu, D., Yue, S., Li, Y., Guo, X., and Lai, X. (2017) Targeting expression of antimicrobial peptide CAMA-Syn by adenovirus vector in macrophages inhibits the growth of intracellular bacteria, *Gene*, **630**, 59-67, doi: 10.1016/j.gene.2017.07.079.
21. Ramos-Espinosa, O., Hernández-Bazán, S., Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., et al. (2016) Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis, *Pathog. Dis.*, **74**, doi: 10.1093/femspd/ftw075.
22. Dolgachev, V., Panicker, S., Balijepalli, S., McCandless, L. K., Yin, Y., et al. (2018) Electroporation-mediated delivery of FER gene enhances innate immune response and improves survival in a murine model of pneumonia, *Gene Therapy*, **25**, 359-375, doi: 10.1038/s41434-018-0022-y.
23. Scidmore, M. A. (2005) Cultivation and laboratory maintenance of *Chlamydia trachomatis*, *Curr. Protoc. Microbiol.*, **11**, 11A.11, doi: 10.1002/9780471729259.mc11a01s00.
24. Joung, J., Konermann, S., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Platt, R. J., Brigham, M. D., Sanjana, N. E., and Zhang, F. (2017) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening, *Nat. Protoc.*, **12**, 828-863, doi: 10.1038/nprot.2017.016.
25. Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., et al. (2016) Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR, *Genome Biol.*, **17**, 148, doi: 10.1186/s13059-016-1012-2.
26. Tiscornia, G., Singer, O., and Verma, I. M. (2006) Production and purification of lentiviral vectors, *Nat. Protoc.*, **1**, 241-245, doi: 10.1038/nprot.2006.37.
27. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, **9**, 671-675, doi: 10.1038/nmeth.2089.
28. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
29. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (2013) An improvement of the 2′(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, *Biostat. Bioinform. Biomath.*, **3**, 71-85.
30. Schittek, B., Paulmann, M., Senyürek, I., and Steffen, H. (2008) The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases, *Infect. Dis. Drug Targets*, **8**, 135-143, doi: 10.2174/1871526510808030135.
31. Schauber, J., and Gallo, R. L. (2008) Antimicrobial peptides and the skin immune defense system, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **122**, 261-266, doi: 10.1016/j.jaci.2008.03.027.
32. Huang, G. T., Zhang, H. B., Kim, D., Liu, L., and Ganz, T. (2002) A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities *in vivo*, *Hum. gene Ther.*, **13**, 2017-2025, doi: 10.1089/10430340260395875.
33. Joo, H. S., Fu, C. I., and Otto, M. (2016) Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **371**, 20150292, doi: 10.1098/rstb.2015.0292.
34. Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2006) Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins, *J. Biol. Chem.*, **281**, 5895-5907, doi: 10.1074/jbc.M511631200.
35. Dimroth, P., Kaim, G., and Matthey, U. (2000) Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases, *J. Exp. Biol.*, **203**, 51-59.
36. Wang, Z. M., Li, X., Cocklin, R. R., Wang, M., Wang, M., Fukase, K., et al. (2003) Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 49044-49052, doi: 10.1074/jbc.M307758200.
37. Lim, J. H., Kim, M. S., Kim, H. E., Yano, T., Oshima, Y., et al. (2006) Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins, *J. Biol. Chem.*, **281**, 8286-8295, doi: 10.1074/jbc.M513030200.
38. Kashyap, D. R., Kuzma, M., Kowalczyk, D. A., Gupta, D., and Dziarski, R. (2017) Bactericidal peptidoglycan recognition protein induces oxidative stress in *Escherichia coli* through a block in respiratory chain and increase in central carbon catabolism, *Mol. Microbiol.*, **105**, 755-776, doi: 10.1111/mmi.13733.
39. Kashyap, D. R., Rompca, A., Gaballa, A., Helmann, J. D., Chan, J., Chang, C. J., Hozo, I., Gupta, D., and Dziarski, R. (2014) Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress, *PLoS Pathogens*, **10**, e1004280, doi: 10.1371/journal.ppat.1004280.
40. Chopra, I., Storey, C., Falla, T. J., and Pearce, J. H. (1998) Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited, *Microbiol. (Reading)*, **144**, 2673-2678, doi: 10.1099/00221287-144-10-2673.
41. Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., et al. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*, *Science*, **282**, 754-759, doi: 10.1126/science.282.5389.754.
42. Liechti, G. W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y. V., VanNieuwenhze, M., and Maurelli, A. T. (2014) A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan

in *Chlamydia trachomatis*, *Nature*, **506**, 507-510, doi: 10.1038/nature12892.
43. Koo, I. C., and Stephens, R. S. (2003) A developmentally regulated two-component signal transduction system in *Chlamydia*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 17314-17319, doi: 10.1074/jbc.M212170200.
44. Witkin, S. S., Minis, E., Athanasiou, A., Leizer, J., and Linhares, I. M. (2017) *Chlamydia trachomatis*: the persistent pathogen, *Clin. Vaccine Immunol.*, **24**, doi: 10.1128/cvi.00203-17.
45. Bobrovsky, P. A., Larin, A. K., Polina, N. F., and Lazarev, V. N. (2019) Transcriptional analysis of HELA cells – producers of the recombinant peptidoglycan recognition protein PGLYRP1 at different stages of the *Chlamydia trachomatis* infection development, *Biomed. Chem. Res. Methods*, **2**, e00113, doi: 10.18097/BMCRM00113.
46. De Wulf, P., Kwon, O., and Lin, E. C. (1999) The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons, *J. Bacteriol.*, **181**, 6772-6778.
47. Deller, M. C., Kong, L., and Rupp, B. (2016) Protein stability: a crystallographer's perspective, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **72**, 72-95, doi: 10.1107/s2053230x15024619.
48. Muheem, A., Shakeel, F., Jahangir, M. A., Anwar, M., Mallick, N., Jain, G. K., Warsi, M. H., and Ahmad, F. J. (2016) A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives, *Saudi Pharm. J.*, **24**, 413-428, doi: 10.1016/j.jsps.2014.06.004.
49. O'Neill, L. A., Bryant, C. E., and Doyle, S. L. (2009) Therapeutic targeting of toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer, *Pharmacol. Rev.*, **61**, 177-197, doi: 10.1124/pr.109.001073.
50. Sierra-Delgado, J. A., Bautista-Nino, P. K., Vargas-Castellanos, C. I., Serrano Diaz, N. C., and Rincon, M. Y. (2019) Immune response and gene therapy with adenoassociated viral vectors, *Medicina*, **79**, 493-501.
51. Bergmann, B., Fei, Y., Jirholt, P., Hu, Z., Bergquist, M., et al. (2020) Pre-treatment with IL2 gene therapy alleviates *Staphylococcus aureus* arthritis in mice, *BMC Infect. Dis.*, **20**, 185, doi: 10.1186/s12879-020-4880-8.
52. Chandler, L. C., Yusuf, I. H., McClements, M. E., Barnard, A. R., MacLaren, R. E., and Xue, K. (2020) Immunomodulatory effects of hydroxychloroquine and chloroquine in viral infections and their potential application in retinal gene therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, doi: 10.3390/ijms21144972.
53. Verma, R., Sahu, R., Singh, D. D., and Egbo, T. E. (2019) A CRISPR/Cas9 based polymeric nanoparticles to treat/inhibit microbial infections, *Seminars Cell Dev. Biol.*, **96**, 44-52, doi: 10.1016/j.semcdb.2019.04.007.
54. Lazarev, V. N., Polina, N. F., Shkarupeta, M. M., Kostrjukova, E. S., Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Grishin, E. V., and Govorun, V. M. (2011) Spider venom peptides for gene therapy of *Chlamydia* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 5367-5369, doi: 10.1128/aac.00449-11.
55. Abe, T., Kaname, Y., Wen, X., Tani, H., Moriishi, K., Uematsu, S., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Kawai, T., Akira, S., and Matsuura, Y. (2009) Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner, *J. Virol.*, **83**, 7629-7640, doi: 10.1128/jvi.00679-09.
56. Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., and Matsuura, Y. (2005) Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus, *J. Virol.*, **79**, 2847-2858, doi: 10.1128/jvi.79.5.2847-2858.2005.
57. Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., et al. (2015) Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, *Nature*, **517**, 583-588, doi: 10.1038/nature14136.

INHIBITION OF CHLAMYDIAL INFECTION BY CRISPR/Cas9-SAM MEDIATED ENHANCEMENT OF HUMAN PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEINS GENE EXPRESSION IN HeLa CELLS

P. A. Bobrovsky[1]*, V. D. Moroz[1], V. N. Lavrenova[1,2], V. A. Manuvera[1], and V. N. Lazarev[1]

[1] *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; E-mail: pbobrovskiy@gmail.com*

[2] *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received July 7, 2020
Revised August 22, 2020
Accepted August 23, 2020

The global problem of emerging resistance of microorganisms to antibiotics makes the search for new natural substances with antibacterial properties relevant. Such substances include peptidoglycan recognition proteins (PGLYRP), which are the components of the innate immunity of many organisms, including humans. These proteins have a unique mechanism of action that allows them to evade the resistance of bacteria to them, as well as to be active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the use of antimicrobial recombinant proteins is not always advisable due to the complexity of local delivery of the proteins and their stability; in this regard it seems appropriate to activate the components of the innate immunity. The aim of this study was to increase the expression level of native peptidoglycan recognition protein genes in HeLa cells using genome-editing technology with synergistic activation mediators (CRISPR/Cas9-SAM) and evaluate antichlamydial effect of PGLYRP. We demonstrated activation of the chlamydial two-component gene system (*ctcB-ctcC*), which played a key role in the mechanism of action of the peptidoglycan recognition proteins. We generated the HeLa cell line transduced with lentiviruses encoding CRISPR/Cas9-SAM activation system with increased PGLYRP gene expression. It was shown that activation of the own peptidoglycan recognition proteins gene expression in the cell line caused inhibition of the chlamydial infection development. The proposed approach makes it possible to use the capabilities of innate immunity to combat infectious diseases caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: peptidoglycan, *Chlamydia trachomatis*, PGLYRP, CRISPR/Cas9

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1550 – 1568

УДК 577.182.48

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСШИРЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО ПРОСТРАНСТВА ЛАНТИБИОТИКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ АНТИБИОТИКОВ

Обзор

© 2020 С.О. Пипия[1], С.С. Терехов[1,2], Ю.А. Мокрушина[1,2], В.Д. Кнорре[1], И.В. Смирнов[1,2]*, А.Г. Габибов[1,2]

[1] *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 Москва, Россия; электронная почта: smirnov@ibch.ru*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 11.08.2020
После доработки 28.09.2020
Принята к публикации 07.10.2020

Открытие антибиотиков послужило одним из ключевых этапов развития человечества, многократно увеличившим выживаемость и повысившим продолжительность жизни миллионов людей по всему миру. Бесконтрольное применение антибиотиков привело к селекции резистентных штаммов бактерий, ставящих под угрозу эффективность современной антимикробной терапии, актуализируя тем самым проблему поиска новых антибиотиков. В течение долгого времени антимикробные пептиды (АМП) считались перспективными кандидатами на роль антибиотиков нового поколения. В то же время практическое применение АМП не нашло широкого применения ввиду спектра проблем с терапевтическими индексами, фармакокинетикой и фармакодинамикой этих соединений, зачастую предопределённого их пептидной природой. Тем не менее генетически кодируемая природа АМП позволяет создавать широкие репертуары искусственного биоразнообразия антибиотиков, открывая беспрецедентные возможности для направленной эволюции антибиотической активности. Лантибиотики представляют собой уникальный класс АМП, обладающих расширенным химическим пространством. Разнообразие посттрансляционных модификаций, механизмов действия на бактериальные мембраны и генетически кодируемая структура делают их удобной молекулярной матрицей для создания высокопредставительных библиотек антимикробных соединений. Поиск новых лекарственных кандидатов среди представителей этого синтетического биоразнообразия чрезвычайно привлекателен, однако требует проведения широкомасштабного высокопроизводительного скрининга антибиотической активности. Комбинация методов синтетической биологии и ультра-высокопроизводительных микрофлюидных платформ позволяет реализовать концепцию направленной эволюции лантибиотиков для быстрого и эффективного создания новых перспективных лекарственных кандидатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: направленная эволюция антимикробной активности, генетически кодируемые антибиотики, ультра-высокопроизводительный скрининг, микрофлюидика, биоинженерия лантибиотиков, открытие лекарственных препаратов, антибиотикорезистентность.

DOI: 10.31857/S0320972520110044

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики десятилетиями служат на благо человечества, спасая миллионы жизней от смертельных инфекций. После открытия пенициллина наступила так называемая «Золотая эра антибиотиков». В период с 1928 по 1980 г. было открыто более 10 классов антибиотиков [1]. Однако в настоящее время из-за их бесконтрольного применения в сельском хозяйстве, а также неправильного и чрезмерного их использования в медицине человечество столкнулось с серьёзной угрозой, вызванной широкомасштабным возникновением устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам. Как сообщает Всемирная организация здравоохранения, человечество стоит на пороге постантибио-

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды; Dha – дегидроаланин; Dhb – дегидробутирин; домен UEV – убиквитин-связывающий домен (ubiquitin E2 variant); PE – фосфатидилэтаноламин; РПП – рибосомально синтезированные и посттрансляционно-модифицируемые пептиды.

* Адресат для корреспонденции.

тической эры [2]. Этот сценарий осложняется и появлением мультирезистентных штаммов, которые более не восприимчивы сразу к нескольким классам антибиотиков. Самыми распространёнными в клинической практике являются метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA), устойчивый к ванкомицину *Staphylococcus aureus* (VRSA) и ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE). Они представляют основную причину серьёзных инфекций, приобретённых в больнице. Помимо этого, клостридиальные инфекции являются часто встречающейся причиной больничной диареи. В последнее время число заражённых, а также смертность растут, и необходимо находить новые способы лечения [3]. Таким образом, научное и медицинское сообщество подчёркивает приоритетную роль исследований, ведущих к созданию альтернативных антимикробных препаратов.

В настоящее время разрабатывается целый ряд подходов для поиска новых антибиотиков. Технологии синтетической биологии и методы рационального дизайна позволяют создавать соединения с улучшенными антимикробными свойствами и характеристиками стабильности [4]. Развитие биоинформатических методов и расширение геномных баз данных позволили использовать технологии геномного майнинга для поиска новых кластеров биосинтеза антимикробных соединений [5]. Технологии высокопроизводительного скрининга находят активное применение в области поиска природных антибиотиков среди экзотических микробных сообществ [6]. Применение искусственного интеллекта для виртуального скрининга библиотек химических соединений на способность проявлять значительную антимикробную активность также показывает многообещающие результаты в данной области [7].

Для разработки новых соединений, применимых в клинической практике, важными критериями являются безопасность и эффективность. Пептиды являются перспективными кандидатами на роль модельных объектов для создания новых препаратов. Они обладают высокой селективностью и эффективностью взаимодействия с мишенями, их метаболизм в организме легко предугадать, развивающиеся технологии пептидного синтеза и биотехнологии позволяют снижать затраты на производство [8]. К настоящему моменту более 60 препаратов пептидной природы были выпущены на рынок и успешно применяются для лечения диабета, рака и орфанных заболеваний [9].

Пептиды также представляют интерес в области разработки антимикробных препаратов. Однако, несмотря на множественные попытки создания терапевтических препаратов, антимикробные пептиды (АМП) не нашли широкого применения на практике. Это обусловливается рядом трудностей, зачастую связанных с их низкой селективностью [10]. Естественный уровень продукции АМП довольно низок, их химический синтез часто сопряжён с техническими трудностями и большими финансовыми вложениями [11]. Одним из наиболее серьёзных недостатков АМП является их подверженность протеолитической деградации, кардинальным образом ухудшающей их фармакокинетические характеристики. Тем не менее среди АМП есть перспективные классы, для которых, используя инструменты направленной эволюции и широкомасштабного скрининга, возможно создание молекул с подходящими для клинического применения свойствами.

Много внимания в настоящее время приковано к рибосомально синтезированным и посттрансляционно-модифицируемым пептидам (RiPPs или РПП). Биосинтез РПП начинается с образования пептида прекурсора. Он состоит из лидерной последовательности, которую узнают модифицирующие ферменты, и структурной последовательности, которая претерпевает последующие модификации. Последним этапом является процессинг лидерной последовательности протеазами и экспорт зрелого РПП во внеклеточную среду [12].

Генетически кодируемая последовательность таких пептидов позволяет легко вводить изменения в их структуру [13]. Большой набор возможных модификаций потенциально создаёт широчайший спектр генерируемых структур и функциональных групп, соединённых в одной молекуле, которая, в свою очередь, может продуцироваться рекомбинантными организмами. Таким образом, РПП обладают уникальными преимуществами для создания соединений с различной биологической активностью, что также позволяет улучшать стабильность этих молекул [14], делая их привлекательными объектами для терапевтического применения [15, 16].

Немалый интерес к данной области подкрепляется развитием технологий полногеномного секвенирования и метагеномного майнинга, благодаря которым увеличивается количество идентифицированных кластеров генов, потенциально отвечающих за биосинтез РПП [17, 18]. Известно примерно 20 семейств РПП, каждое из которых имеет свои особенности структуры, биосинтеза пептидов и биологической активности [19]. К ним относятся лантипептиды, цианобактины, ботрамицины, лассо-пептиды, микровиридины и другие.

ЛАНТИПЕПТИДЫ И ЛАНТИБИОТИКИ

Лантипептиды – группа рибосомально синтезированных и посттрансляционно-модифицированных пептидов, продуцируемых грамположительными бактериями [20]. Они имеют в своём составе остатки неканонических аминокислот лантионина и метил-лантионина, которые образуют внутримолекулярные тиоэфирные связи (рис. 1, *а*), и ряд других модификаций, таких как дегидратирование остатков Thr или Ser с образованием остатков дегидробутирина (Dhb) и дегидроаланина (Dha), *N*-концевое ацилирование и др. Лантипептиды закодированы в геноме продуцента в виде препептида, состоящего из лидерной последовательности и структурного пептида. Лидерная последовательность распознается ферментами модификации и направляет созревание лантипептида. Структурный пептид подвергается модификациям и после отрезания лидерной последовательности становится активной молекулой (рис. 1, *б*). Известно, что лантипептиды могут играть роль сигнальных или регуляторных молекул [21, 22], однако наибольший интерес среди них вызывают так называемые лантибиотики – лантипептиды, обладающие антимикробной активностью.

Гены, кодирующие ферменты биосинтеза лантипептидов, часто идентифицируют в виде кластеров на хромосомах, мобильных элементах или плазмидах грамположительных бактерий. Согласно принятым обозначениям [23], ген, кодирующий структурный пептид, обозначается как *lanA*, ферменты, осуществляющие основные модификации – *lanB* и *lanC* или *lanM*, *lanL* (для мультифункциональных ферментов лантибиотиков 2 и 4 класса), *lanT* – для белка-транспортера, *lanP* – для специфической протеазы, процессирующей лидерную последовательность, для дополнительных модифицирующих ферментов предусмотрены свои обозначения. *Lan* в названии гена или его продукта заменяется на соответствующее сокращение, принятое для конкретного лантибиотика.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛАНТИБИОТИКОВ

Современная система классификации лантибиотиков основана на различии в строении ферментов, осуществляющих дегидратацию и циклизацию структурного пептида, и механизмах внесения данных модификаций [19]. На сегодняшний день выделяют 4 основных класса лантипептидов (рис. 2).

Класс I. К данному классу относятся лантибиотики, для которых основные модификации вносят два отдельных фермента: LanB, который осуществляет дегидратацию, и LanC, обеспечивающий циклизацию и образование остатков лантионина и метиллантионина. Также в кластер биосинтеза входят специфические протеазы, ABC-транспортеры, ферменты, вносящие дополнительные модификации, регуляторные элементы и белки, обеспечивающие собственный иммунитет продуцента к лантибиотику. Геномные исследования показали, что гены клас-

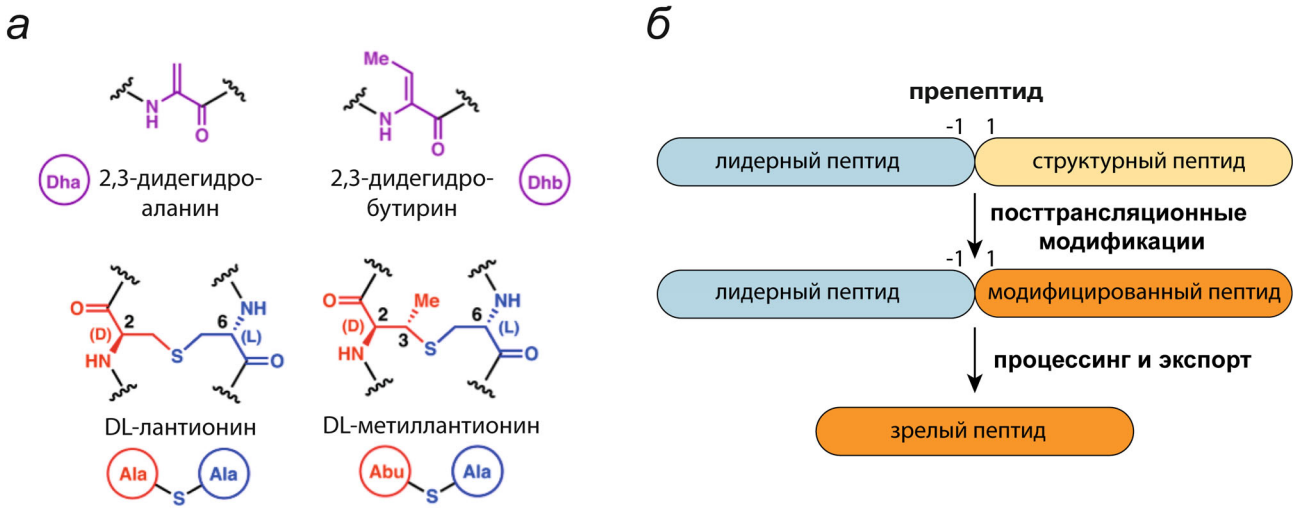


Рис. 1. *а* – Структура дегидратированных аминокислотных остатков и тиоэфирных кросс-сшивок, характерных для лантипептидов. *б* – Общая схема биосинтеза лантипептидов; адаптировано из [20]; Dha – дегидроаланин, Dhb – дегидробутирин, Abu – альфа-аминомасляная кислота. (С цветными вариантами рис. 1–8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

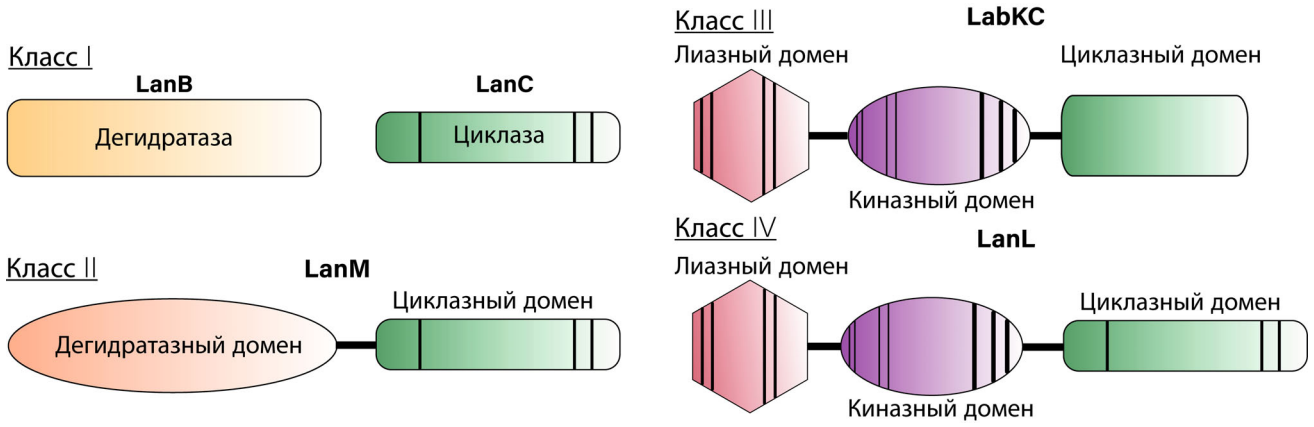


Рис. 2. Схематическое представление ферментов биосинтеза лантибиотиков. Вертикальные полосы обозначают консервативные участки, необходимые для каталитической активности, ширина полос схематически иллюстрирует относительный размер консервативного участка

тера биосинтеза класса I лантибиотиков широко распространены среди бактерий, входящих в разнообразные отделы [24].

Также на основе сходства лидерной последовательности препептида, которая узнается системой модификации, лантипептиды данного класса подразделяются на подгруппы: низин-подобные, эпидермин-подобные и Pep5-подобные лантипептиды.

Отличительной особенностью класса I лантибиотиков является механизм дегидратации структурного пептида. Его исследования в основном были сконцентрированы на примере низина, как наиболее изученного и значимого представителя класса. Однако, несмотря на успехи в получении гетерологической системы биосинтеза низина [25], долгое время исследователям не удавалось реконструировать этот процесс *in vitro*. Первые положительные результаты были продемонстрированы в работе Garg et al. [26], в которой добавление в реакционную смесь АТФ, $MgCl_2$ и клеточного лизата из *Escherichia coli* к NisB приводило к полноценной дегидратации препептида NisA. При анализе мутантных форм фермента было обнаружено образование глутаминированного промежуточного соединения, которое было способно превращаться в дегидратированный пептид без добавления вспомогательных компонентов. Окончательный механизм дегидратации, осуществляемый NisB, был раскрыт после определения роли источника остатков глутамата – глутамил-тРНК [27]. Таким образом, LanB активирует гидроксил на боковой группе Ser/Thr через присоединение остатка глутамата от глутамил-тРНК. Затем происходит направленная диссоциация α-протона активированной аминокислоты, приводящая к β-элиминированию глутамата с образованием дегидроаминокислоты (рис. 3, *а*).

Циклизация и формирование тиоэфирного кольца осуществляются ферментом LanC. По своей структуре он является гомологом циклазного домена мультифункциональных ферментов LanM [28] и LanL [29] лантибиотиков классов II и IV соответственно. Сходство обусловлено наличием у этих групп ферментов цинк-связывающего домена, что может говорить о схожих механизмах циклизации.

Транспорт зрелого пептида осуществляется посредством специфических транспортеров LanT. Мембранная ассоциация, а также наличие двух АТФ-связывающих Уокер-мотивов говорит об их принадлежности к семейству ABC-транспортеров [30]. В процессе транспорта LanT распознают лидерную последовательность, в то время как структурный пептид может отличаться от природного [31]. Подобная лабильность позволяет использовать машинерию биосинтеза лантибиотиков для создания разнообразных биологически активных соединений с улучшенными свойствами *in vivo*. Процессинг лидерного пептида осуществляется субтилизин-подобной сериновой протеазой LanP. Она может быть заякорена на мембране или локализована в цитоплазме. Однако не для всех протеаз до конца установлено, в какой момент происходит процессинг лидерной последовательности – до или после транспорта соответствующим LanT. Так, для NisP показана внеклеточная локализация, а протеолиз лидерной последовательности происходит уже после секреции препептида. Для эффективного узнавания субстрата и последующего протеолиза необходимо наличие хотя бы одного лантионина в структурной части препептида [32].

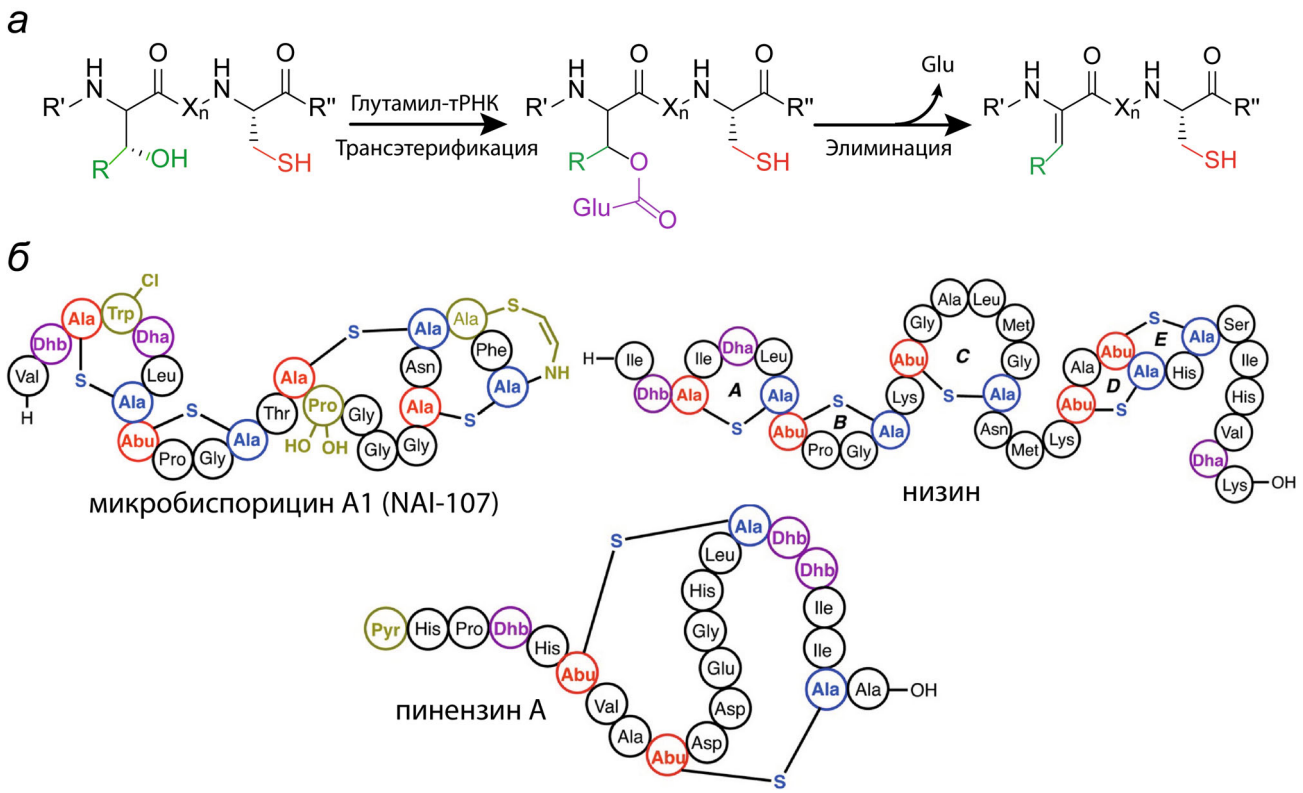


Рис. 3. *а* – Схема дегидратации лантибиотиков класса I ферментом LanB; *б* – структуры некоторых лантибиотиков класса I с различными посттрансляционными модификациями. Lac – лактат, Dha – дегидроаланин, Dhb – дегидробутирин, Pyr – 2-оксопропионил, Abu – альфа-аминомасляная кислота, R′, R″ – участки полипептидной цепи лантипептида, X_n – участок полипептидной цепи, состоящий из n-кол-ва остатков аминокислот, где n – число от 1 до 20; адаптировано из [20]

Помимо основных модификаций, среди представителей данного класса лантипептидов распространено наличие лактата на *N*-конце полипептидной цепи [33] или ацетилирования [34], а также образования аминовинил цистеина (AviCys) на *C*-конце [35] (рис. 3, *б*). Самым известным представителем лантибиотиков класса I является низин, который более 50 лет успешно используется в качестве консерванта в пищевой промышленности [36]. Лантибиотик микробиспорицин A1, также известный как NAI-107, обладает ярко выраженной активностью по отношению к клинически значимым патогенам, таким как *S. aureus* MRSA, *Clostridium difficile*. NAI-107 проходит стадии предклинических исследований для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными бактериями [37, 38]. Особенностью данного лантибиотика является наличие галогенированного остатка Trp и моно- или дигидроксилирование остатка Pro, которые необходимы для обеспечения антимикробной активности [39].

Класс II. В этот класс входят лантибиотики, дегидратацию и циклизацию которых выполняет мультифункциональный фермент LanM. На *N*-конце фермента расположен домен, ответственный за дегидратацию препептида. *C*-концевой домен гомологичен циклазе LanC лантибиотиков класса I и имеет цинк-связывающий домен. Исследования активности фермента *in vitro* показали, что для осуществления дегидратации необходимо присутствие АТФ и ионов Mg^{2+}, а использование аналогов природного субстрата приводило к образованию промежуточного соединения, фосфорилированного по остаткам Ser/Thr [40]. Таким образом, у лантибиотиков класса II, а также III и IV, описанных далее, дегидратация остатков Ser и Thr происходит через стадию фосфорилирования, в то время как для лантибиотиков класса I процесс идет через глутаминированные производные (рис. 4). Для *N*-концевого домена LanM была обнаружена структурная гомология по отношению к эукариотическим липидкиназам, например фосфоинозитид-3-киназе (PI3K) [41], при этом последовательности этих ферментов имеют низкую идентичность.

Дегидратация и циклизация осуществляются ферментами LanM независимо, что подтверждается экспериментами с индивидуальной экспрессией каждого домена [42, 43]. Важным свойством лантипептидсинтетаз является стро-

гая стереоселективность в образовании тиоэфирных мостиков и региоселективность. Исключительным случаем является фермент CylM, модифицирующий двухкомпонентный лантибиотик класса II, цитолизин, из *Enterococcus faecalis*. Цитолизин состоит из двух пептидов: цитолизин L и цитолизин S, которые содержат два варианта метиллантионина – в классической конфигурации DL, характерной для большинства лантибиотиков, и более редкой – LL [44]. Таким образом, CylM способен формировать тиоэфирные мостики разной конфигурации внутри одного пептида. Лантипептидсинтетаза ProcM имеет широкий спектр субстратной специфичности. Анализ кластера биосинтеза прохлорозинов, к которому принадлежит ProcM, показал наличие 30 пептидов с разной аминокислотной последовательностью. Несмотря на большое количество вариантов субстратов, ProcM модифицирует каждый препептид в лантипептид со строго определенной морфологией [45]. На сегодняшний день семейство ProcM-подобных ферментов имеет самый широкий спектр субстратной специфичности [46].

В большинстве случаев транспорт осуществляется специфическим ABC-транспортером – LanT, который имеет также протеазный домен [47]. В процессе транспорта препептида через мембрану лидерная последовательность удаляется, и во внеклеточную среду секретируется уже активный лантибиотик. Протеолиз происходит в области Gly-Gly мотива на *C*-конце лидера. Для осуществления транспорта LanT важна лидерная последовательность пептида, в то время как структурный пептид может отличаться от нативного [48]. Однако в случае с прохлорозинами и лихнецидином транспортер также толерантен и к лидерному пептиду, что подтверждают найденные отличия в лидерной последовательности среди лантибиотиков одного кластера. Для некоторых лантибиотиков класса II обнаруживают отдельные протеазы, которые осуществляют протеолиз нескольких амино-

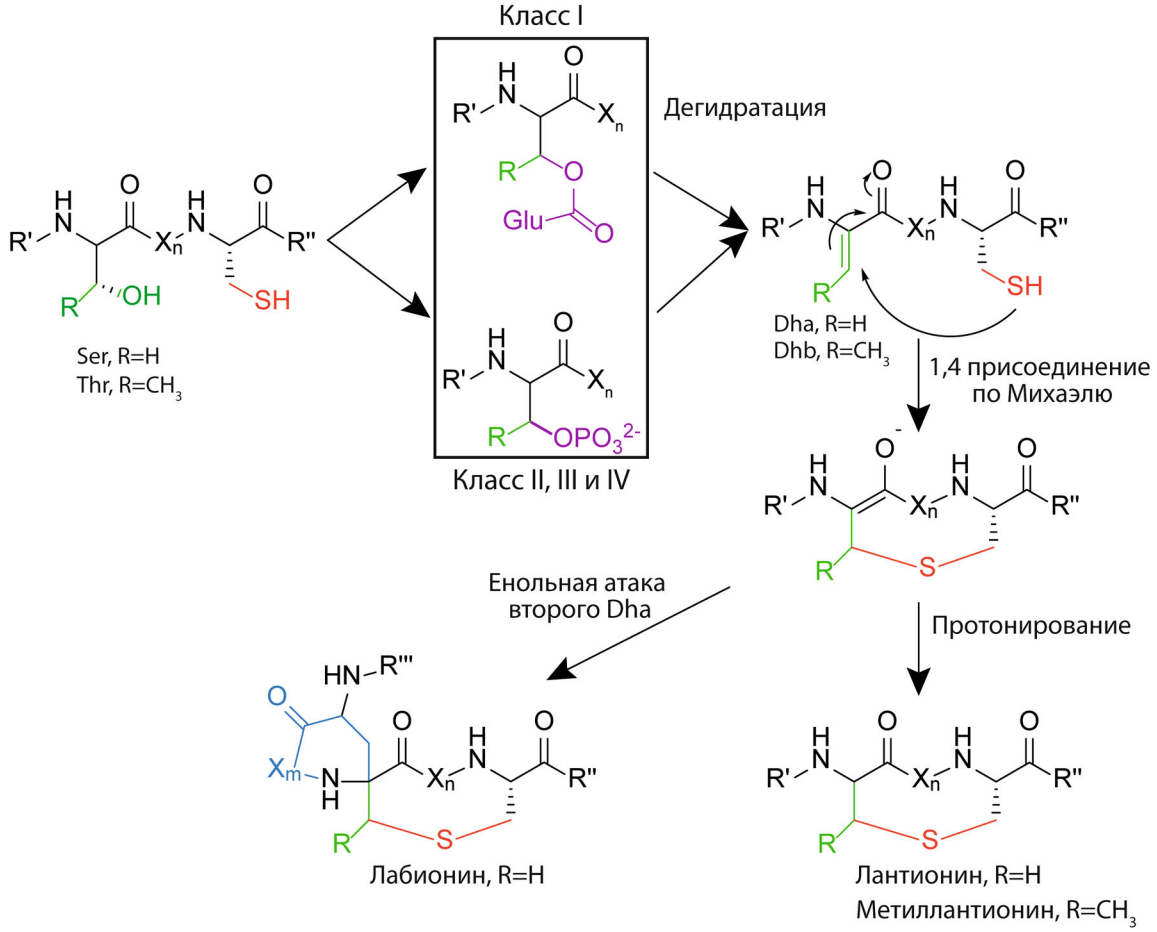


Рис. 4. Схема формирования тиоэфирных аминокислот при биосинтезе лантипептидов разных классов. Dha – дегидроаланин, Dhb – дегидробутирин, R′, R″ – участки полипептидной цепи лантипептида, $X_{n,m}$ – участок полипептидной цепи, состоящий из n- или m-кол-ва остатков аминокислот, где n и m – числа от 1 до 20

кислот с *N*-конца структурного пептида уже после процессинга лидерной последовательности [49].

Лантибиотики класса II отличаются более глобулярной структурой по сравнению с классом I, также среди них выделяют уникальную группу – двупептидные лантибиотики. Их антибиотическая активность обусловлена двойственным механизмом связывания с липидом II и формированием поры. Среди представителей этой группы можно выделить лактицин 3147, который активен против широкого спектра грамположительных бактерий, в том числе метицилин-резистентного *S. aureus*, ванкомицин-резистентного *E. faecalis*, *Propionibacterium acne* и *Streptococcus mutans* [50]. Другой двупептидный лантибиотик – галодурацин – проявляет большую активность по отношению к ванкомицин-резистентному *E. faecalis*, чем низин, и обладает большей стабильностью при физиологических условиях [51]. Традиционно в качестве источников новых лантибиотиков рассматривались молочнокислые бактерии, однако благодаря развитию в области полногеномного секвенирования и алгоритмов поиска новых кластеров все больше активных лантибиотиков находят и за пределами этой группы бактерий. Кластер биосинтеза тицина A4 был обнаружен в бактерии *Bacillus thuringiensis* BMB3201 [52]. Данный лантибиотик проявлял сходную с низином активность по отношению к широкому спектру грамположительных бактерий. Было установлено, что тицин A4 сохранял антибиотические свойства в диапазоне pH 2–9, а также обладал умеренной устойчивостью к обработке такими протеазами, как трипсин, папаин и α-амилаза.

Примером лантибиотика класса II, успешного с точки зрения медицинского применения, является NVB302. Это полусинтетическое производное дезоксиактагардина – лантибиотика из бактерии *Actinoplanes garbadinensis.* В 2012 г. компания Novacta сообщила об успешном прохождении первой стадии клинических исследований NVB302 по лечению инфекций, вызванных *C. difficile*. NVB302 имеет схожую с ванкомицином эффективность против *C. difficile*, его преимуществом является более быстрое восстановление популяции бактерий *Bacteroides fragilis* после окончания терапии [53]. *B. fragilis* являются частью нормальной микробиоты кишечника. Предполагается, что менее жёсткое влияние антибиотика на эту группу бактерий при клостридиальных инфекциях ведёт к меньшим флуктуациям в анаэробной кишечной микрофлоре и уменьшает риск возникновения рецидивов [54].

Класс III. Этот класс лантипептидов был выделен относительно недавно. Основные модификации выполняет мультифункциональный фермент LanKC [55]. В отличие от LanM, LanKC состоит из трех доменов: *N*-концевого лиазного, центрального киназного и *C*-концевого циклазного. Лиазный и киназный домены осуществляют дегидратацию, а циклазный домен формирует тиоэфирные кольца. LanKC не имеет цинк-связывающего мотива, однако проявляет гомологию с другими циклазными доменами [56]. Отличия наблюдаются и в структуре пептидов, поскольку среди некоторых представителей этого класса характерно формирование лабионина. Такие пептиды выделяют в группу лабиринтопептинов. Образование дополнительной связи углерод–углерод в лабионине происходит при атаке дегидроаланином енольного промежуточного соединения, которое в случае протонирования перешло бы в лантионин [57]. Реконструкция биосинтеза лабиринтопептинов *in vitro* показала, что процесс дегидратации происходит последовательно с *C*-конца пептида к *N*-концу, а лабионин формируется из мотива Ser(Xxx)2Ser(Xxx)3Cys. Дегидратация происходит через фосфорилированное производное, как в случае с лантибиотиками класса II. LanKC ферменты способны использовать в качестве субстрата разные нуклеозидтрифосфаты: LabKC при модификации лабиринтопептина использует только ГТФ [58], а AviKC, синтезирующий катенулипептин, способен использовать в качестве субстрата АТФ, ТТФ, ГТФ и ЦТФ [59].

Долгое время было неизвестно, как именно происходит процессинг лидерной последовательности, поскольку внутри кластера биосинтеза не было обнаружено специфической протеазы или транспортера с протеазным доменом. В процессе биосинтеза часто наблюдалось наличие нескольких остатков от лидерной последовательности на *N*-конце структурного пептида, поэтому основным предположением было наличие эндопептидазы, которая процессирует лидер, и аминопептидазы, удаляющей оставшиеся аминокислоты. Открытие лантипептида NAI-122 и изучение его биосинтетического кластера показало наличие специфической протеазы AplP с двойственной функцией [60]. Это цинк-зависимая бифункциональная протеаза с эндо- и аминопептидазной активностью. Вначале AplP, как эндопептидаза, отрезает лидерную последовательность по консервативному мотиву EL-Q, затем удаляет оставшиеся аминокислоты, как аминопептидаза [61]. Дальнейший анализ показал наличие AplP-подобных протеаз во всех геномах продуцентов лантипептидов

класса III, однако они находились за пределами их кластера биосинтеза. *In vitro* была подтверждена способность таких протеаз к формированию зрелых лантипептидов.

Известные на сегодняшний день лантипептиды класса III не проявляют явных антимикробных свойств, поэтому к ним не применяется термин лантибиотики. Считается, что они выполняют регуляторные функции в качестве сигнальных молекул. Для SapT показана способность стимулирования формирования воздушных гиф у стрептомицетов [62]. Потенциальное применение лантипептидов не ограничено наличием антибиотической активности. Исследования на мышиной модели боли показали антиноцицептивное действие лантипептида NAI-122 из *Actinoplanes* DSM 24059 [63]. Системное введение 1–10 мкг/кг NAI-122 приводило к дозозависимому снижению проявления болевого поведения, вызванного формалином у мышей. Также лантипептид проявлял активность в экспериментах по купированию хронической боли. Для некоторых лантипептидов было показано наличие противовирусных свойств. Лабиринтопептин A1 проявлял значительную активность против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса герпеса на клеточных моделях [64]. Синергическое действие с клинически одобренными антиретровирусными препаратами и низкая токсичность по отношению к вагинальным штаммам *Lactobacillus* показывают его потенциал в области лечения заболеваний, передающихся половым путем.

Класс IV. Это одна из наименее изученных групп лантипептидов, известных на сегодняшний день. Первая охарактеризованная система биосинтеза лантипептида класса IV была обнаружена в *Streptomyces venezuelae* после геномного скрининга на поиск белков гомологичных LanC. Пептид получил название венецуелин, а его синтетаза – VenL [65]. Лантипептидсинтетазы класса IV LanL – это мультифункциональные ферменты, состоящие из трех доменов: лиазный и киназный домены гомологичны таковым у LanKC, а циклазный – LanM, поскольку имеет характерный цинк-связывающий мотив. Несмотря на наличие всех компонентов кластера биосинтеза венецуелина, его продукция не была детектирована у штамма дикого типа. Определение структуры и свойств пептида и фермента LanL проводилось *in vitro*. В ходе филогенетического анализа актинобактерий на наличие LanC-подобных белков были выделены семейства лантипептид-подобных генетических кластеров [66]. В частности, это позволило обнаружить несколько венецуелин-подобных пептидов, распространённых среди бактерий рода *Streptomyces*. Подобным образом был обнаружен другой лантипептид из этого семейства, продуцируемый *Streptomyces collinus* Tu 365, – стрептоколлин [67]. На примере системы биосинтеза глобиспорицина было проведено исследование процессов дегидратации и циклизации ферментом LanL [68]. Было установлено, что фермент SgbL узнает α-спиральный участок лидерного пептида, расположенный в его *N*-концевой части, при этом распознавание происходит в киназной части SgbL, но не в лиазной. Процесс дегидратации происходит последовательно с *N*-конца к *C*-концу структурного пептида через фосфорилированное производное.

Специфической протеазы для процессинга лидерной последовательности лантипептидов класса IV на настоящий момент не обнаружено. Предполагается, что созревание лантипептида происходит при участии собственных эндопептидаз и аминопептидаз продуцента.

В настоящее время биологическая функция лантипептидов класса IV остаётся неизвестной. Для стрептоколлина была обнаружена умеренная ингибирующая активность по отношению к протеинтирозинфосфатазе 1B (PTP1B) – 33% ингибирования при концентрации стрептоколлина 50 мкМ [67].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАНТИБИОТИКОВ

Впервые антимикробный эффект лантибиотиков был обнаружен в 1927 г. при изучении ингибирующего влияния *Lactococcus lactis* на рост *Lactobacillus bulgaricus* [69], и в 1947 г. Mattick et al. [70] выделили из культивационной среды *L. lactis* лантибиотик низин. Сейчас он широко используется в пищевой промышленности многих стран в качестве консерванта (пищевая добавка E243). Низин является наиболее исследованным представителем лантибиотиков с широко изученным спектром антимикробной активности, механизмом действия и биосинтеза.

Липид II является основной мишенью для многих лантибиотиков на поверхности грамположительных бактерий. Эта молекула играет важнейшую роль в формировании клеточной стенки бактерий. Она играет роль переносчика пептидогликанов клеточной стенки бактерий с внутренней стороны мембраны, где они образуются, на наружную, где созревает клеточная стенка. Поскольку количество молекул липида II в мембране бактерий ограничено [71], его связывание с молекулами лантибиотика блокирует синтез клеточной стенки, что в дальнейшем приводит к гибели клетки. Важной особенностью

липида II является его консервативность среди прокариот, поэтому антибиотики, связывающие липид II, обладают широким спектром активности и оставляют перспективную область исследований для поиска новых антибиотиков [72]. Эта молекула является уникальной для прокариот, что делает подобные антимикробные агенты потенциально безопасными для эукариотических клеток. В группу антибиотиков, связывающих липид II, входит ванкомицин – трициклический гликопептид, использующийся в медицине при лечении серьёзных инфекционных заболеваний, в том числе вызванных мультирезистентными бактериями, и является одним из «антибиотиков последнего резерва». Однако в последнее время растёт количество штаммов патогенных бактерий резистентных к ванкомицину. В этой связи лантибиотики могут перенять эстафету, поскольку связываются с другим участком на молекуле липида II (рис. 5) и могут ингибировать рост бактерий, резистентных к известным антибиотикам. В экспериментах *in vitro* было показано, что лантибиотик микробиспорицин способен останавливать рост штамма *E. faecalis*, резистентного к ванкомицину с минимальной ингибирующей концентрацией 0,5 мкг/мл [39], низин – 4 мкг/мл [39], двупептидный лантибиотик лактицин 3147 – 1,9 мкг/мл [73].

Помимо ингибирования биосинтеза клеточной стенки, некоторые лантибиотики способны

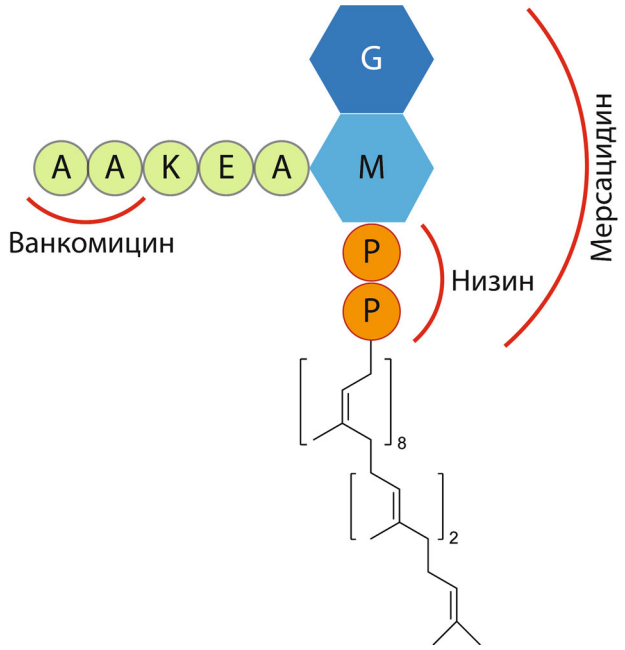


Рис. 5. Схема строения липида II; G – N-ацетилглюкозамин, M – N -ацетилмурамовая кислота, P – фосфатная группа; красными линиями отмечены области связывания ванкомицина, низина и мерсацидина

формировать поры в плазматической мембране (рис. 6), что также приводит к гибели бактериальной клетки [74]. Образование поры в большинстве случаев является липид II-зависимым, поскольку именно так лантибиотик связывается с мембраной бактерии. В случае низина два кольца в *N*-концевой части формируют пирофосфат-связывающий карман, который связывает ундекапренилпирофосфатную часть липида II, а *C*-конец принимает участие в образовании поры [75]. В исследовании Hasper et al. [76] было показано, что в образовании поры участвуют 8 молекул низина и 4 молекулы липида II, которые обеспечивают связывание лантибиотика с мембраной.

Обособленно находится группа циннамицин-подобных лантибиотиков, в которую также входит дурамицин и анковерин. Помимо глобулярной структуры и наличия остатка неканонической аминокислоты – лизиноаланина, они отличаются мишенью, с которой связываются на клеточной мембране, а именно – фосфатидилэтаноламином [77]. Фосфатидилэтаноламин (PE) – важный представитель фосфолипидов, одной из функций которого является распределение отрицательного заряда на мембране, он также играет роль предшественника для синтеза других фосфолипидов, принимает участие в сигнальных каскадах [78] и придаёт особые физико-химические свойства плазматической мембране, необходимые для функционирования мембранных белков [79]. В эукариотических клетках PE в основном представлен на внутренней поверхности плазматической мембраны. Для большинства бактерий PE является главным цвиттерионным фосфолипидом. При этом у грамотрицательных бактерий содержание PE в мембране выше, чем у грамположительных бактерий [80]. Высокая селективность циннамицин-подобных лантибиотиков по отношению к PE обеспечивается за счёт формирования сети водородных связей с фосфатами липидов. В отличие от более объёмной холиновой группы фосфатидилхолина, компактная структура амммоний-связывающего домена циннамицин-подобных лантибиотиков комплементарна небольшой группе PE [81]. Точный механизм антимикробного действия этой группы лантибиотиков до сих пор неизвестен, однако предполагается, что связывание циннамицина с фосфатидилэтаноламином приводит к увеличению проницаемости клеточной мембраны, что и приводит к гибели клетки [82]. Для дурамицина было показано изменение морфологии и нарушение целостности клеток у чувствительных штаммов *Bacillus* BC15 и *Bacillus subtilis* 168 [83]. Было установлено, что

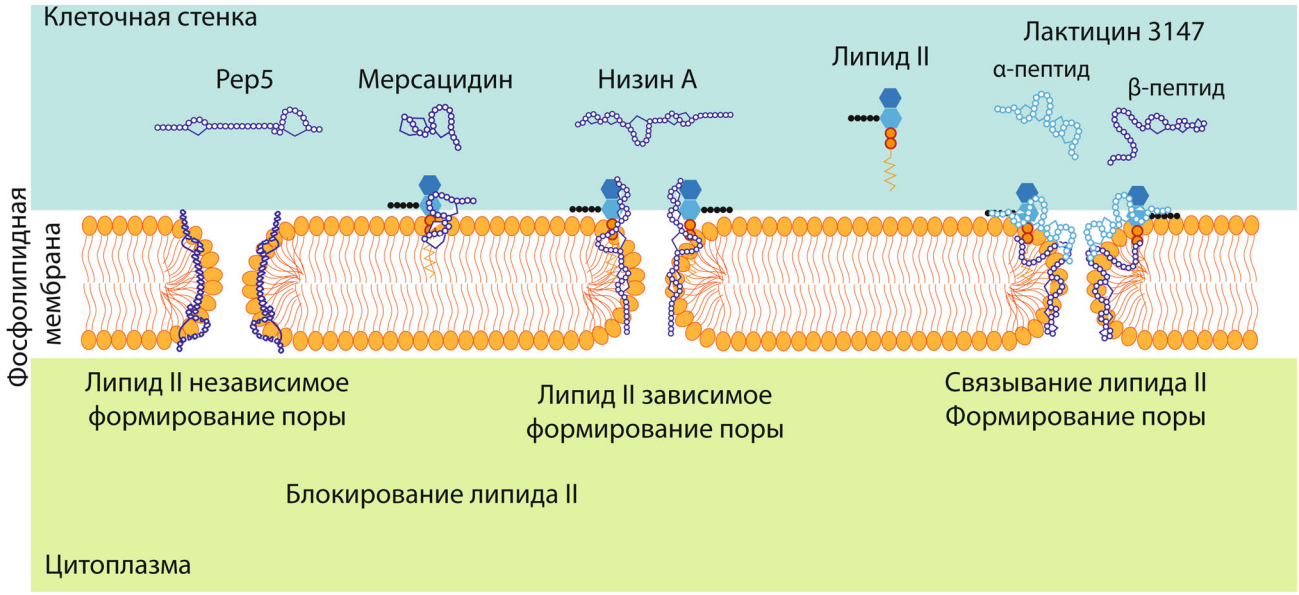


Рис. 6. Схематическое представление разных механизмов антимикробного действия лантибиотиков на грамположительные бактерии

чувствительные штаммы бактерий развивали резистентность и к более высоким его концентрациям после инкубации с низкой концентрацией лантибиотика. Анализ состава бактериальных мембран до и после появления резистентности показал, что бактерии с приобретённой устойчивостью имели пониженное содержание фосфатидилэтаноламина. Таким образом, чувствительность микроорганизмов к лантибиотикам из семейства циннамицинов явно коррелирует с фосфолипидным составом бактериальных мембран, что ограничивает их применение в качестве антибиотиков широкого спектра. Тем не менее селективность по отношению к PE находит потенциальное применение в медицине. Дурамицин проходит вторую фазу клинических испытаний в качестве лекарства для лечения муковисцидоза [84]. Связывание дурамицина с PE на поверхности эпителиальных клеток лёгких стимулирует секрецию хлорид-ионов, что, в свою очередь, влечёт секрецию воды и стимулирует очищение лёгких от слизи. Циннамицин-подобные лантибиотики также находят применение в биоимиджинге. Фосфатидилэтаноламин становится широко представленным на поверхности клетки при апоптозе [85], а также при делении эукариотической клетки [86], что позволяет использовать его в качестве молекулярного маркера при изучении клеточных процессов. Для детекции PE на поверхности клеток используют биотинилированные или радиоактивно-меченные дурамицин и циннамицин [87].

БИОИНЖЕНЕРИЯ ЛАНТИБИОТИКОВ И НАПРАВЛЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Лантибиотики обладают высоким потенциалом в области создания новых противомикробных препаратов. Традиционная стратегия в поиске антибиотиков заключается в выделении природного штамма-продуцента из разных источников и анализе антимикробных свойств его метаболитов. Такой подход имеет ограничения, поскольку подходит только для культивируемых бактерий. Благодаря развитию технологий полногеномного секвенирования и геномного майнинга появляется возможность открывать новые ранее не выделенные из природных источников лантибиотики, в том числе и среди представителей некультивируемых микроорганизмов. Для изучения обнаруживаемых биосинтетических кластеров лантибиотиков используют различные подходы синтетической биологии от бесклеточных систем до гетерологической продукции.

Бесклеточные системы практически не ограничены в размерах комбинаторной библиотеки, поскольку нет необходимости в трансформации клеток продуцента – стадии, лимитирующей данный параметр в клеточных системах биосинтеза. *In vitro* система синтеза библиотеки лантипептидов была разработана на основе мРНК дисплея [88]. Основой для пептидного синтеза являлась *in vitro* транскрибированная мРНК. Для соединения мРНК с транслируемым пепти-

дом использовался олигонуклеотид, несущий пуромицин на 3′-конце открытой рамки считывания. Данный олигонуклеотид присоединялся к 3′-концу мРНК посредством фотоиндуцируемой кросс-сшивки за счёт наличия на его 5′-конце псоралена. Аминокислота лизин была заменена на 4-селенолизин, который при обработке перекисью водорода трансформировался в дегидроаланин. После иммобилизации препептида на колонке и соответствующей смены буферов происходило формирование лантионинов. Таким образом, была получена полностью искусственная бесферментативная система для создания более чем 10^{11} вариантов лантипептидов. С её помощью были выделены молекулы с высокой специфичностью к сортазе A – ферменту, ответственному за вирулентность *S. aureus*.

Использование гетерологических систем экспрессии позволяет нарабатывать их в количествах, достаточных для проведения полноценных исследований их структуры и функций. Гетерологические системы экспрессии кластеров лантибиотиков находят применение в широкомасштабном скрининге библиотек мутантных вариантов лантибиотиков и поиске более активных и стабильных соединений.

L. lactis – представитель молочнокислых бактерий, который часто используется для гетерологической экспрессии белков. На основе его кластера биосинтеза низина была создана система экспрессии NICE (NIsin-Controlled Expression system) [89]. Продукция низина в *L. lactis* и других низин-продуцирующих бактериях является автоиндуцируемой. При появлении в среде низина мембранно-ассоциированная киназа NisK автофосфорилируется, затем фосфорилирует внутриклеточный регуляторный белок NisR, который связывается с промотором *nisA* и запускает экспрессию генов, стоящих за ним. Таким образом, обеспечивается регулируемая гиперэкспрессия необходимого рекомбинантного лантибиотика. Кластер биосинтеза лантибиотика класса II нукацина ISK-1 был исследован с помощью NICE системы [90]. Данный подход позволил снизить уровень протеолитической деградации лантибиотика, которая наблюдалась у природного продуцента, а также определить минимальный набор генов, необходимых для продукции активного лантибиотика.

Многочисленные структурно-функциональные исследования лантибиотиков показали наличие характерных мотивов и определенной топологии колец, обеспечивающих присущий им механизм действия, например пирофосфат-связывающая полость у низин-подобных лантибиотиков [75] или мотив, связывающий липид II [91]. Основываясь на подобной модульной системе, была создана библиотека искусственных лантипептидов, которые состояли из комбинации модулей 12 известных лантибиотиков. Соответствующие генетические конструкции были использованы для трансформации бактерии-продуцента *L. lactis*, имеющей в своём геноме кластер биосинтеза низина, осуществляющего посттрансляционные модификации и транспорт зрелого лантипептида во внеклеточную среду. Для быстрого тестирования биологической активности бактерии продуценты помещались в альгинатные шарики вместе с индикаторным штаммом бактерии и специфической протеазой, процессирующей лидерный пептид для высвобождения активного лантибиотика. После инкубации и окрашивания флуоресцентным красителем шарики сортировались с помощью проточной цитофлуориметрии. Химерные молекулы, состоящие из модулей галлидермина и низина, показали улучшенную активность по отношению к *Streptococcus pneumoniae* в сравнении с природными лантибиотиками. Подобная технология имеет перспективы для тестирования активности потенциальных пептидных препаратов *in vivo*, поиска соединений с новыми спектрами биологической активности.

E. coli является самым распространенным микроорганизмом для гетерологической экспрессии белков и пептидов, в том числе и антимикробной природы [92]. Преимуществами её использования в работе являются простота, лёгкость проведения генетических манипуляций, доступность различных вариантов экспрессии: от добавления меток для увеличения растворимости и упрощения очистки рекомбинантного белка до направления продукции в периплазматическое пространство [93]. Несколько систем биосинтеза лантибиотиков были успешно реконструированы с использованием *E. coli* в качестве продуцента [25]. Прохлорозины, синтезированные в *E. coli*, имели значительно больший выход по сравнению с природным продуцентом *Prochlorococcus* MIT 9313, при этом являлись полностью модифицированными.

После разработки гетерологических систем экспрессии следует этап их применения для поиска новых улучшенных вариантов лантибиотиков. Лидерная последовательность ингибирует антимикробные свойства полностью модифицированного лантибиотика. Поэтому после наработки и очистки препептида используют коммерчески доступные протеазы, процессирующие полипептид. Необходимость очистки, а также последующей обработки протеазами усложняет процесс анализа активности лантибиотиков, особенно при скрининге большого коли-

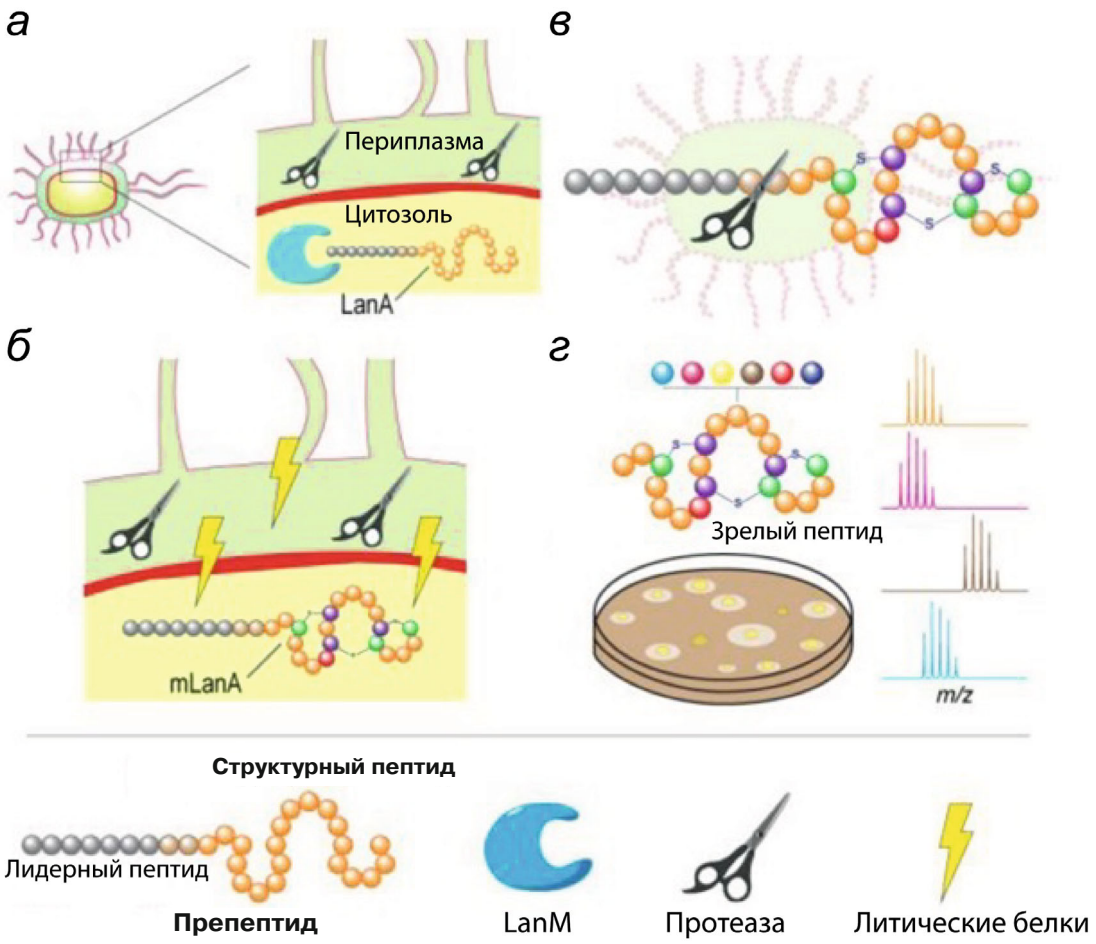


Рис. 7. Схематическое изображение системы для продукции зрелых лантибиотиков класса II в *E. coli*; *а* – периплазматическая компартментализация протеазы; *б* – температурная индукция экспрессии автолитических белков; *в* – процессинг лидерного пептида после автолиза; *г* – структурно-функциональный скрининг вариантов лантипептидов на колониях с помощью метода диффузии в агаре и matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) анализа; адаптировано из [94]

чества вариантов. Для решения данной проблемы была предложена система, позволяющая процессировать лидерный пептид внутри колоний *E. coli* для быстрого скрининга лантибиотической активности [94]. Лантипептид синтезировался внутриклеточно, в то время как продукция специфической лантипептидпротеазы LicP была направлена в периплазматическое пространство (рис. 7). После индуцированного температурой автолиза клеток протеаза и препептид высвобождались из клеток, затем происходил процессинг активного лантибиотика, который детектировали по образованию зон ингибирования роста. Успешное применение такой системы было продемонстрировано на примерах двупептидного лантибиотика галодурацина и лантибиотика лактицина 481.

Благодаря генетически кодируемой природе лантибиотиков возможно легко вносить изменения в их структуру. Это позволяет использовать методы направленного или случайного мутагенеза для создания лантибиотиков с улучшенными свойствами, а также для понимания их структурно-функциональных особенностей. Мутации R13A и K2A/R13A лантибиотика мутацин 1140 приводили к увеличению устойчивости к протеолизу трипсином [95]. Замена остатка Met21 на Val в молекуле низина приводила к увеличению активности по отношению к *Listeria monocytogenes*, а мутант N20P был более активен против *S. aureus* [96].

Лантибиотики в основном действуют на грамположительные бактерии, поскольку грамотрицательные бактерии защищены от их действия внешней оболочкой. Для расширения спектра действия лантибиотиков принимаются различные попытки по созданию химерных молекул, способных преодолевать внешнюю мембрану и атаковать грамотрицательные бактерии. Было предложено использовать конъюгаты

лантибиотика галлидермина с молекулами сидерофоров [97]. Предполагалось, что наличие специфических рецепторов к сидерофорам на внешней мембране помогут конъюгату преодолеть внешний барьер и сделать внутреннюю мембрану доступной для лантибиотика. Однако, несмотря на сохранившуюся активность по отношению к индикаторной грамположительной бактерии *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP, грамотрицательные бактерии оказались невосприимчивы к антимикробному действию конъюгата. Альтернативно, короткие пептиды с известной активностью против грамотрицательных бактерий были соединены с *C*-концом полноразмерного или укороченного низина [98]. Несколько вариантов таких химерных молекул ингибировали рост индикаторных штаммов. Для наиболее перспективных вариантов был проведен рациональный дизайн. В результате было получено соединение в 4–12 раз более активное по отношению к ряду важных грамотрицательных патогенов в сравнении с низином.

Наличие макроциклов в структуре лантибиотиков делают их удобными мишенями для разработки ингибиторов белок-белковых взаимодействий, поскольку они могут выступать в роли структурных аналогов природным лигандам. В сравнении с синтетическими методами синтеза генетически кодируемая природа лантибиотиков позволяет создавать огромные библиотеки вариантов и совмещать пептидный синтез со скринингом внутри клетки. Существует множество подходов к отбору соединений из библиотек с необходимыми свойствами, одним из них является обратный двугибридный анализ (reverse two-hybrid system (RTHS)). Данный метод был использован для получения ингибитора взаимодействия между белком p6 вируса иммунодефицита человека с убиквитин-связывающим доменом UEV (ubiquitin E2 variant) белка человека TSG101 [99]. Такие ингибиторы имеют высокий терапевтический потенциал в противовирусной терапии, поскольку нарушают процесс отпочковывания ВИЧ от заражённой клетки. В качестве основы для создания библиотеки

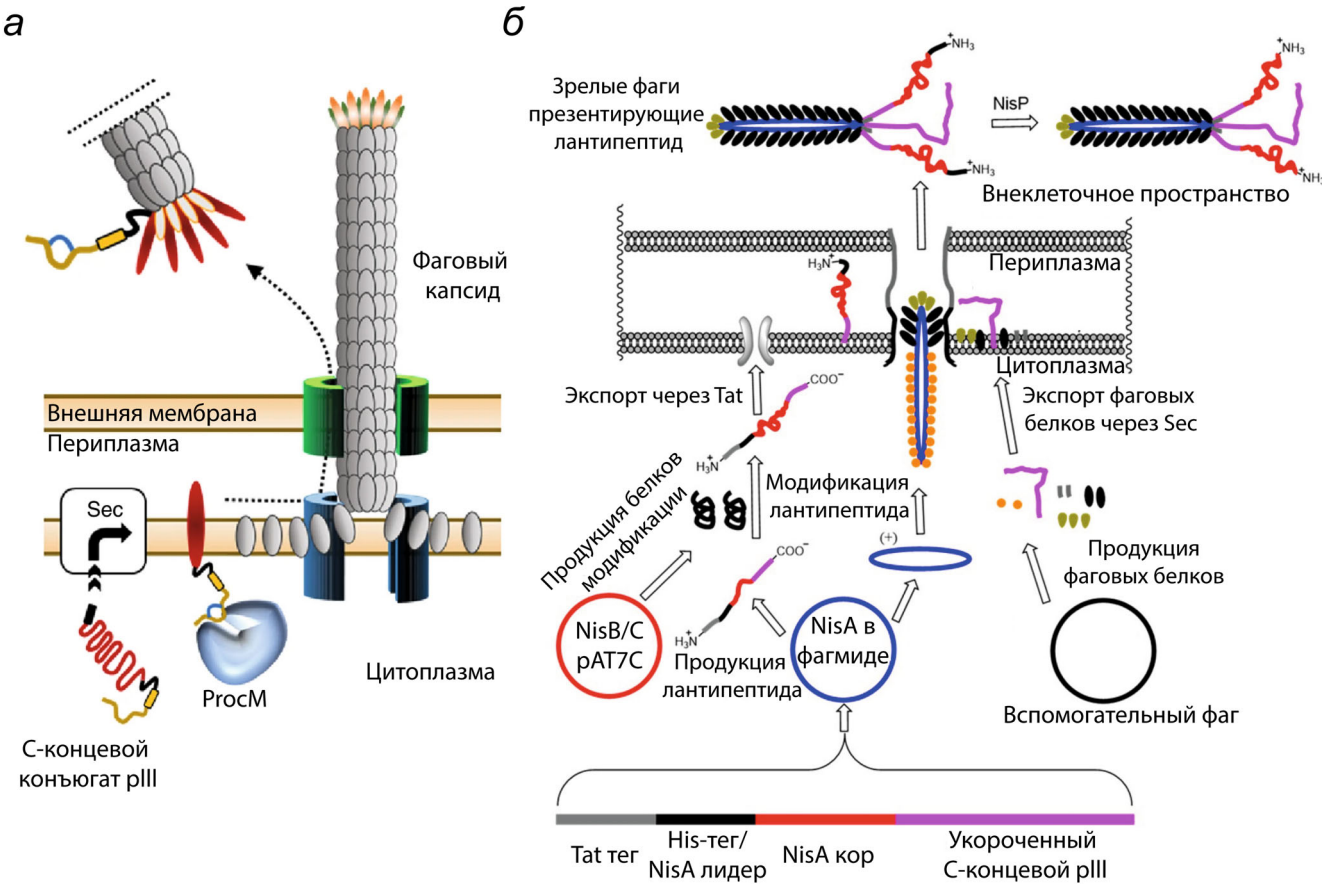


Рис. 8. Схема созревания фаговых частиц. *а* – *C*-концевой дисплей лантипептидов, модифицированных ProcM; адаптировано из [101]; *б* – *N*-концевой дисплей библиотеки лантипептидов на основе системы биосинтеза низина; адаптировано из [102]

макроциклов была использована последовательность лантипептида ProcA2.8, а формирование тиоэфирных связей осуществляла лантипептидсинтетаза ProcM, известная высокой толерантностью к субстрату. Белки p6 и домен UEV продуцируются внутриклеточно в виде химерных молекул с функциональными репрессорами. Их физическое взаимодействие приводит к ингибированию экспрессии репортерных генов, обеспечивающих рост бактерии на селективной среде. Таким образом, среди бактерий, трансформированных библиотекой лантипептидов, на селективной среде вырастут только те, чей вариант пептида ингибирует взаимодействие между p6 и доменом UEV. Результатом отбора стал ингибитор XY3-3, который проявлял потенциальную противовирусную активность, детектированную с использованием клеточной модели созревания вирусных частиц *in vitro*.

Фаговый дисплей является мощным инструментом в *in vitro* селекции, широко используемый для скрининга пептидных лигандов к выбранной мишени [100]. Эту технологию также применяют для скрининга лантипептидных библиотек. Кластер биосинтеза прохлорозинов с ProcM синтетазой был взят за основу для создания *C*-концевой библиотеки пептидов [101]. Препептид соединяли с *C*-концом pIII белка капсида бактериофага M13. Все модификации проходили в цитоплазме. Фаговый дисплей модифицированных пептидов осуществлялся в результате включения конъюгата pIII в фаговую оболочку с последующей экструзией частицы фага в среду (рис. 8, *а*).

По результатам отбора были получены лиганды к стрептавидину и урокиназному активатору плазминогена, что показывает потенциал использования системы биосинтеза лантипептидов совместно с технологией фагового дисплея.

Для дисплея библиотеки вариантов лантибиотика низина была разработана технология *N*-концевого фагового дисплея [102]. В отличие от предыдущей работы, секреция конъюгата в периплазму осуществлялась по Tat-пути, который позволяет транслоцировать свернутые белки (рис. 8, *б*). Вектором отбора служила улучшенная стабильность производных низина при более высоких значениях pH. Однако, несмотря на успешную селекцию нескольких вариантов и сохранение способности связывать липид II, антимикробная активность была утеряна. Также был представлен вариант дрожжевого дисплея, в котором лантибиотик лактицин 481 был соединён с белком клеточной стенки дрожжей. Модификации происходили в эндоплазматическом ретикулуме. После подтверждения наличия всех необходимых модификаций с помощью анализа биологической активности и масс-спектрометрии очищенного лантибиотика была создана библиотека аналогов лактицина 481. В ходе селекции были получены пептиды, способные к связыванию с $\alpha v\beta 3$ интегрином. Результаты исследования показывают универсальность применения лантипептидных кластеров биосинтеза для поиска соединений с новыми биологическими свойствами.

ВЫВОДЫ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

В эпоху быстро распространяющейся резистентности к антибиотикам необходимо разрабатывать системы, позволяющие ускорить процесс идентификации новых антимикробных агентов. Для этого крайне важно находить новые источники биологического разнообразия и создавать подходы для эффективного анализа большого количества данных. Технологии направленной эволюции антибиотической активности позволяют создавать искусственное разнообразие антимикробных агентов и отбирать из этого разнообразия наиболее эффективные варианты с точки зрения их практического применения. Высокопроизводительный скрининг соединений, генерируемых биохимическими машинериями, представляет при этом особый интерес. Объединение этапов синтеза и проверки биологической активности в единой системе в перспективе позволят сократить количество стадий анализа молекул-кандидатов, времени, а также экономических затрат.

В настоящее время большое развитие получили микрофлюидные технологии. В частности, капельная микрофлюидика успешно применяется в различных биологических исследованиях. Основным преимуществом является возможность локализации реакций в индивидуальных каплях, что позволяет проводить сотни миллионов реакций параллельно [103]. Это свойство успешно применяется при разработке платформ полного цикла для ультра-высокопроизводительного скрининга и направленной эволюции полипептидов [104]. Инкапсуляция на уровне единичных клеток даёт возможность детально изучать влияние множества факторов на физиологическое состояние микроорганизмов [105], проводить широкомасштабный скрининг антибиотической активности среди представителей разных микробиологических сообществ [106].

Лантибиотики, в свою очередь, имеют большой потенциал в качестве универсальной матрицы для создания молекул с заданными биологи-

ческими функциями: от ингибиторов белок-белковых взаимодействий до терапевтических препаратов и антибиотиков нового поколения. Объединение биосинтетических машинерий, генерирующих множество вариантов лантибиотиков, с технологиями микрофлюидики позволит проводить широкомасштабный поиск соединений, активных по отношению к заданной мишени. Использование гетерологических систем продукции лантибиотиков, а также адаптация бесклеточных систем для генерации биологически активных лантибиотиков *in vitro* являются одними из ключевых этапов дальнейшего развития данной технологии. Объединение этапов биосинтеза и тестирования биологической активности синтетического разнообразия рекомбинантных лантибиотиков в индивидуальных микрокомпартментах позволит добиться непревзойдённой производительности скрининга, открывая уникальные возможности для анализа ландшафтов антимикробной активности генетически кодируемых антибиотиков и создания высокоэффективных терапевтических агентов.

Финансирование. Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08054) и Российского научного фонда (грант № 17-74-30019).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies, J., and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74**, 417-433, doi: 10.1128/mmbr.00016-10.
2. O'Neill, J. (2014) *Antimicrobial Resistance: Tackling A Crisis For The Health And Wealth Of Nations*, Review on Antimicrobial Resistance, London.
3. Czepiel, J., Drozdz, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultanska, D., Garlicki, A., and Biesiada, G. (2019) *Clostridium difficile* infection: review, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **38**, 1211-1221, doi: 10.1007/s10096-019-03539-6.
4. Wang, J., Xiong, Z., Meng, H., Wang, Y., and Wang, Y. (2012) Synthetic biology triggers new era of antibiotics development, *Subcell Biochem.*, **64**, 95-114, doi: 10.1007/978-94-007-5055-5_5.
5. Foulston, L. (2019) Genome mining and prospects for antibiotic discovery, *Curr. Opin. Microbiol.*, **51**, 1-8, doi: 10.1016/j.mib.2019.01.001.
6. Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Malakhova, M. V., Samoilov, A. E., Manolov, A. I., et al. (2018) Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9551-9556, doi: 10.1073/pnas.1811250115.
7. Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., et al. (2020) A deep learning approach to antibiotic discovery, *Cell*, **180**, 688-702, doi: 10.1016/j.cell.2020.01.021.
8. Lau, J. L., and Dunn, M. K. (2018) Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 2700-2707, doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
9. Fosgerau, K., and Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug Discov. Today*, **20**, 122-128, doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
10. Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., and He, Q. (2019) The antimicrobial peptides and their potential clinical applications, *Am. J. Transl. Res.*, **11**, 3919-3931.
11. Kang, S. J., Park, S. J., Mishig-Ochir, T., and Lee, B. J. (2014) Antimicrobial peptides: therapeutic potentials, *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, **12**, 1477-1486, doi: 10.1586/14787210.2014.976613.
12. Ortega, M. A., and van der Donk, W. A. (2016) New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products, *Cell Chem. Biol.*, **23**, 31-44, doi: 10.1016/j.chembiol.2015.11.012.
13. McIntosh, J. A., Donia, M. S., and Schmidt, E. W. (2009) Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds, *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 537-559, doi: 10.1039/b714132g.
14. Muller, M. M. (2018) Post-translational modifications of protein backbones: unique functions, mechanisms, and challenges, *Biochemistry*, **57**, 177-185, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00861.
15. Hudson, G. A., and Mitchell, D. A. (2018) RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential, *Curr. Opin. Microbiol.*, **45**, 61-69, doi: 10.1016/j.mib.2018.02.010.
16. Mullane, K., Lee, C., Bressler, A., Buitrago, M., Weiss, K., et al. (2015) Multicenter, randomized clinical trial to compare the safety and efficacy of LFF571 and vancomycin for *Clostridium difficile* infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 1435-1440, doi: 10.1128/aac.04251-14.
17. Poorinmohammad, N., Bagheban-Shemirani, R., and Hamedi, J. (2019) Genome mining for ribosomally synthesised and post-translationally modified peptides (RiPPs) reveals undiscovered bioactive potentials of actinobacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **112**, 1477-1499, doi: 10.1007/s10482-019-01276-6.
18. Velasquez, J. E., and van der Donk, W. A. (2011) Genome mining for ribosomally synthesized natural products, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 11-21, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.027.
19. Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., et al. (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, *Nat. Prod. Rep.*, **30**, 108-160, doi: 10.1039/C2NP20085F.
20. Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., and van der Donk, W. A. (2017) Mechanistic understanding of lan-

thipeptide biosynthetic enzymes, *Chem. Rev.*, **117**, 5457-5520, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00591.
21. Kleerebezem, M. (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis, *Peptides*, **25**, 1405-1414, doi: 10.1016/j.peptides.2003.10.021.
22. Willey, J. M., Willems, A., Kodani, S., and Nodwell, J. R. (2006) Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in Streptomyces coelicolor, *Mol. Microbiol.*, **59**, 731-742, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05018.x.
23. Bierbaum, G., Gotz, F., Peschel, A., Kupke, T., van de Kamp, M., and Sahl, H. G. (1996) The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**, 119-127, doi: 10.1007/BF00399417.
24. Zhang, Q., Yu, Y., Velasquez, J. E., and van der Donk, W. A. (2012) Evolution of lanthipeptide synthetases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18361-18366, doi: 10.1073/pnas.1210393109.
25. Shi, Y., Yang, X., Garg, N., and van der Donk, W. A. (2011) Production of lantipeptides in *Escherichia coli*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2338-2341, doi: 10.1021/ja109044r.
26. Garg, N., Salazar-Ocampo, L. M., and van der Donk, W. A. (2013) *In vitro* activity of the nisin dehydratase NisB, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7258-7263, doi: 10.1073/pnas.1222488110.
27. Ortega, M. A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M. C., van der Donk, W. A., and Nair, S. K. (2015) Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB, *Nature*, **517**, 509-512, doi: 10.1038/nature13888.
28. Siezen, R. J., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (1996) Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**, 171-184, doi: 10.1007/BF00399422.
29. Goto, Y., Okesli, A., and van der Donk, W. A. (2011) Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family, *Biochemistry*, **50**, 891-898, doi: 10.1021/bi101750r.
30. Hollenstein, K., Dawson, R. J., and Locher, K. P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 412-418, doi: 10.1016/j.sbi.2007.07.003.
31. Kuipers, A., de Boef, E., Rink, R., Fekken, S., Kluskens, L. D., Driessen, A. J., Leenhouts, K., Kuipers, O. P., and Moll, G. N. (2004) NisT, the transporter of the lantibiotic nisin, can transport fully modified, dehydrated, and unmodified prenisin and fusions of the leader peptide with non-lantibiotic peptides, *J. Biol. Chem.*, **279**, 22176-22182, doi: 10.1074/jbc.M312789200.
32. Lagedroste, M., Smits, S. H. J., and Schmitt, L. (2017) Substrate specificity of the secreted nisin leader peptidase NisP, *Biochemistry*, **56**, 4005-4014, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00524.
33. Velasquez, J. E., Zhang, X., and van der Donk, W. A. (2011) Biosynthesis of the antimicrobial peptide epilancin 15X and its N-terminal lactate, *Chem. Biol.*, **18**, 857-867, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.05.007.
34. Huang, E., and Yousef, A. E. (2015) Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*, *Microbiol. Res.*, **181**, 15-21, doi: 10.1016/j.micres.2015.08.001.
35. Allgaier, H., Jung, G., Werner, R. G., Schneider, U., and Zähner, H. (1985) Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized, tetracyclic heterodetic polypeptide antibiotic, *Angew. Chem. Internat. Ed. Engl.*, **24**, 1051-1053, doi: 10.1002/anie.198510511.
36. de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., and Vessoni Penna, T. C. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review, *Trends Food Sci. Technol.*, **20**, 146-154, doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.056.
37. Lepak, A. J., Marchillo, K., Craig, W. A., and Andes, D. R. (2015) *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of the lantibiotic NAI-107 in a neutropenic murine thigh infection model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 1258-1264, doi: 10.1128/AAC.04444-14.
38. Thomsen, T. T., Mojsoska, B., Cruz, J. C., Donadio, S., Jenssen, H., Lobner-Olesen, A., and Rewitz, K. (2016) The Lantibiotic NAI-107 efficiently rescues *Drosophila melanogaster* from infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 5427-5436, doi: 10.1128/AAC.02965-15.
39. Castiglione, F., Lazzarini, A., Carrano, L., Corti, E., Ciciliato, I., et al. (2008) Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens, *Chem. Biol.*, **15**, 22-31, doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.009.
40. Chatterjee, C., Miller, L. M., Leung, Y. L., Xie, L., Yi, M., Kelleher, N. L., and van der Donk, W. A. (2005) Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15332-15333, doi: 10.1021/ja0543043.
41. Dong, S. H., Tang, W., Lukk, T., Yu, Y., Nair, S. K., and van der Donk, W. A. (2015) The enterococcal cytolysin synthetase has an unanticipated lipid kinase fold, *eLife*, **4**, e07607, doi: 10.7554/eLife.07607.
42. Ma, H., Gao, Y., Zhao, F., and Zhong, J. (2015) [Individual catalytic activity of two functional domains of bovicin HJ50 synthase BovM], *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **55**, 50-58.
43. Shimafuji, C., Noguchi, M., Nishie, M., Nagao, J., Shioya, K., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2015) *In vitro* catalytic activity of *N*-terminal and *C*-terminal domains in NukM, the post-translational modification enzyme of nukacin ISK-1, *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 624-629, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.020.
44. Tang, W., Jimenez-Oses, G., Houk, K. N., and van der Donk, W. A. (2015) Substrate control in stereoselective lanthionine biosynthesis, *Nat. Chem.*, **7**, 57-64, doi: 10.1038/nchem.2113.
45. Thibodeaux, C. J., Ha, T., and van der Donk, W. A. (2014) A price to pay for relaxed substrate specificity: a comparative kinetic analysis of the class II lanthipeptide synthetases ProcM and HalM2, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 17513-17529, doi: 10.1021/ja5089452.
46. Cubillos-Ruiz, A., Berta-Thompson, J. W., Becker, J. W., van der Donk, W. A., and Chisholm, S. W. (2017) Evolutionary radiation of lanthipeptides in marine cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E5424-E5433, doi: 10.1073/pnas.1700990114.
47. Nishie, M., Sasaki, M., Nagao, J., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2011) Lantibiotic transporter requires cooperative functioning of the peptidase domain and the ATP binding domain, *J. Biol. Chem.*, **286**, 11163-11169, doi: 10.1074/jbc.M110.212704.
48. Kuipers, A., Meijer-Wierenga, J., Rink, R., Kluskens, L. D., and Moll, G. N. (2008) Mechanistic dissection of the enzyme complexes involved in biosynthesis of lacticin 3147 and nisin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6591-6597, doi: 10.1128/AEM.01334-08.
49. Caetano, T., Barbosa, J., Moesker, E., Sussmuth, R. D., and Mendo, S. (2014) Bioengineering of lanthipeptides in *Escherichia coli*: assessing the specificity of lichenicidin and

haloduracin biosynthetic machinery, *Res. Microbiol.*, **165**, 600-604, doi: 10.1016/j.resmic.2014.07.006.
50. Galvin, M., Hill, C., and Ross, R. P. (1999) Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays, *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 355-358, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00550.x.
51. Oman, T. J., and van der Donk, W. A. (2009) Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin, *ACS Chem. Biol.*, **4**, 865-874, doi: 10.1021/cb900194x.
52. Xin, B., Zheng, J., Xu, Z., Li, C., Ruan, L., Peng, D., and Sun, M. (2015) Three novel lantibiotics, ticins A1, A3, and A4, have extremely stable properties and are promising food biopreservatives, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 6964-6972, doi: 10.1128/aem.01851-15.
53. Crowther, G. S., Baines, S. D., Todhunter, S. L., Freeman, J., Chilton, C. H., and Wilcox, M. H. (2013) Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an in vitro human gut model of *Clostridium difficile* infection, *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 168-176, doi: 10.1093/jac/dks359.
54. Louie, T. J., Emery, J., Krulicki, W., Byrne, B., and Mah, M. (2009) OPT-80 eliminates *Clostridium difficile* and is sparing of bacteroides species during treatment of *C. difficile* Infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 261-263, doi: 10.1128/aac.01443-07.
55. Knerr, P. J., and van der Donk, W. A. (2012) Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides, *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 479-505, doi: 10.1146/annurev-biochem-060110-113521.
56. Kodani, S., Hudson, M. E., Durrant, M. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. R., and Willey, J. M. (2004) The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11448-11453, doi: 10.1073/pnas.0404220101.
57. Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., et al. (2010) Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 1151-1154, doi: 10.1002/anie.200905773.
58. Krawczyk, B., Ensle, P., Müller, W. M., and Süssmuth, R. D. (2012) Deuterium labeled peptides give insights into the directionality of class III lantibiotic synthetase LabKC, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9922-9925, doi: 10.1021/ja3040224.
59. Muller, W. M., Schmiederer, T., Ensle, P., and Sussmuth, R. D. (2010) In vitro biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic labyrinthopeptin A2 including formation of a C-C bond as a post-translational modification, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 2436-2440, doi: 10.1002/anie.200905909.
60. Völler, G. H., Krawczyk, J. M., Pesic, A., Krawczyk, B., Nachtigall, J., and Süssmuth, R. D. (2012) Characterization of new class III lantibiotics—erythreapeptin, avermipeptin and griseopeptin from *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces griseus* demonstrates stepwise *N*-terminal leader processing, *Chembiochem*, **13**, 1174-1183, doi: 10.1002/cbic. 201200118.
61. Iorio, M., Sasso, O., Maffioli, S. I., Bertorelli, R., Monciardini, P., et al. (2014) A glycosylated, labionin-containing lanthipeptide with marked antinociceptive activity, *ACS Chem. Biol.*, **9**, 398-404, doi: 10.1021/cb400692w.
62. Chen, S., Xu, B., Chen, E., Wang, J., Lu, J., Donadio, S., Ge, H., and Wang, H. (2019) Zn-dependent bifunctional proteases are responsible for leader peptide processing of class III lanthipeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2533-2538, doi: 10.1073/pnas.1815594116.
63. Kodani, S., Lodato, M. A., Durrant, M. C., Picart, F., and Willey, J. M. (2005) SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes, *Mol. Microbiol.*, **58**, 1368-1380, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04921.x.
64. Ferir, G., Petrova, M. I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., et al. (2013) The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications, *PLoS One*, **8**, e64010, doi: 10.1371/journal.pone.0064010.
65. Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M. J., and van der Donk, W. A. (2010) Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights, *PLoS Biol.*, **8**, e1000339, doi: 10.1371/journal.pbio.1000339.
66. Zhang, Q., Doroghazi, J. R., Zhao, X., Walker, M. C., and van der Donk, W. A. (2015) Expanded natural product diversity revealed by analysis of lanthipeptide-like gene clusters in actinobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 4339-4350, doi: 10.1128/AEM.00635-15.
67. Iftime, D., Jasyk, M., Kulik, A., Imhoff, J. F., Stegmann, E., Wohlleben, W., Süssmuth, R. D., and Weber, T. (2015) Streptocollin, a type IV lanthipeptide produced by *Streptomyces collinus* Tü 365, *Chembiochem.*, **16**, 2615-2623, doi: 10.1002/cbic.201500377.
68. Hegemann, J. D., and van der Donk, W. A. (2018) Investigation of substrate recognition and biosynthesis in class IV lanthipeptide systems, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 5743-5754, doi: 10.1021/jacs.8b01323.
69. Rogers, L. A. (1928) The inhibiting effect of Streptococcus Lactis on Lactobacillus Bulgaricus, *J. Bacteriol.*, **16**, 321-325, doi: 10.1128/JB.16.5.321-325.1928.
70. Mattick, A. T. R., Hirsch, A., and Berridge, N. J. (1947) Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci, *Lancet*, **250**, 5-8, doi: 10.1016/S0140-6736(47)90004-4.
71. van Heijenoort, Y., Gomez, M., Derrien, M., Ayala, J., and van Heijenoort, J. (1992) Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of *Escherichia coli*: possible roles of PBP 1b and PBP 3, *J. Bacteriol.*, **174**, 3549-3557, doi: 10.1128/jb.174.11.3549-3557.1992.
72. Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006) Lipid II as a target for antibiotics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 321-323, doi: 10.1038/nrd2004.
73. Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2009) A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus species*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 546-551, doi: 10.1093/jac/dkp221.
74. Dischinger, J., Basi Chipalu, S., and Bierbaum, G. (2014) Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care, *Int. J. Med. Microbiol.*, **304**, 51-62, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003.
75. Hsu, S.-T. D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A. G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. J. J., and van Nuland, N. A. J. (2004) The nisin—lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 963-967, doi: 10.1038/nsmb830.
76. Hasper, H. E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2004) Assembly and stability of nisin-lipid II pores, *Biochemistry*, **43**, 11567-11575, doi: 10.1021/bi049476b.
77. Märki, F., Hänni, E., Fredenhagen, A., and van Oostrum, J. (1991) Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2,

Biochem. Pharmacol., **42**, 2027-2035, doi: 10.1016/0006-2952(91)90604-4.
78. Vance, J. E., and Tasseva, G. (2013) Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1831**, 543-554, doi: 10.1016/j.bbalip.2012.08.016.
79. Gbaguidi, B., Hakizimana, P., Vandenbussche, G., and Ruysschaert, J. M. (2007) Conformational changes in a bacterial multidrug transporter are phosphatidylethanolamine-dependent, *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1571-1582, doi: 10.1007/s00018-007-7031-0.
80. Epand, R. M., and Epand, R. F. (2009) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 289-294, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.023.
81. Vestergaard, M., Berglund, N. A., Hsu, P. C., Song, C., Koldso, H., Schiott, B., and Sansom, M. S. P. (2019) Structure and dynamics of cinnamycin-lipid complexes: mechanisms of selectivity for phosphatidylethanolamine lipids, *ACS Omega*, **4**, 18889-18899, doi: 10.1021/acsomega.9b02949.
82. Choung, S. Y., Kobayashi, T., Takemoto, K., Ishitsuka, H., and Inoue, K. (1988) Interaction of a cyclic peptide, Ro09-0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **940**, 180-187, doi: 10.1016/0005-2736(88)90193-9.
83. Hasim, S., Allison, D. P., Mendez, B., Farmer, A. T., Pelletier, D. A., Retterer, S. T., Campagna, S. R., Reynolds, T. B., and Doktycz, M. J. (2018) Elucidating duramycin's bacterial selectivity and mode of action on the bacterial cell envelope, *Front. Microbiol.*, **9**, 219, doi: 10.3389/fmicb.2018.00219.
84. Jones, A. M., and Helm, J. M. (2009) Emerging treatments in cystic fibrosis, *Drugs*, **69**, 1903-1910, doi: 10.2165/11318500-000000000-00000.
85. Elvas, F., Stroobants, S., and Wyffels, L. (2017) Phosphatidylethanolamine targeting for cell death imaging in early treatment response evaluation and disease diagnosis, *Apoptosis*, **22**, 971-987, doi: 10.1007/s10495-017-1384-0.
86. Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K., and Umeda, M. (1996) Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12867-12872, doi: 10.1073/pnas.93.23.12867.
87. Zhao, M. (2011) Lantibiotics as probes for phosphatidylethanolamine, *Amino acids*, **41**, 1071-1079, doi: 10.1007/s00726-009-0386-9.
88. Hofmann, F. T., Szostak, J. W., and Seebeck, F. P. (2012) *In vitro* selection of functional lantipeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 8038-8041, doi: 10.1021/ja302082d.
89. Zhou, X. X., Li, W. F., Ma, G. X., and Pan, Y. J. (2006) The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements, *Biotechnol. Adv.*, **24**, 285-295, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.001.
90. Aso, Y., Nagao, J.-I., Koga, H., Okuda, K.-I., Kanemasa, Y., Sashihara, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2004) Heterologous expression and functional analysis of the gene cluster for the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1, *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 429-436, doi: 10.1016/S1389-1723(05)00308-7.
91. Böttiger, T., Schneider, T., Martнnez, B., Sahl, H.-G., and Wiedemann, I. (2009) Influence of Ca^{2+} ions on the activity of lantibiotics containing a mersacidin-like lipid II binding motif, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4427-4434, doi: 10.1128/aem.00262-09.
92. Li, Y. (2011) Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review, *Protein Expr. Purif.*, **80**, 260-267, doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001.
93. Mesa-Pereira, B., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2018) Heterologous expression of biopreservative bacteriocins with a view to low cost production, *Front. Microbiol.*, **9**, 1654, doi: 10.3389/fmicb.2018.01654.
94. Si, T., Tian, Q., Min, Y., Zhang, L., Sweedler, J. V., van der Donk, W. A., and Zhao, H. (2018) Rapid screening of lanthipeptide analogs via in-colony removal of leader peptides in *Escherichia coli*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 11884-11888, doi: 10.1021/jacs.8b05544.
95. Geng, M., and Smith, L. (2018) Modifying the lantibiotic mutacin 1140 for increased yield, activity, and stability, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, doi: 10.1128/AEM.00830-18.
96. Field, D., Connor, P. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2008) The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens, *Mol. Microbiol.*, **69**, 218-230, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06279.x.
97. Yoganathan, S., Sit, C. S., and Vederas, J. C. (2011) Chemical synthesis and biological evaluation of gallidermin-siderophore conjugates, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2133-2141, doi: 10.1039/c0ob00846j.
98. Li, Q., Montalban-Lopez, M., and Kuipers, O. P. (2018) Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against gram-negative pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, doi: 10.1128/AEM.00052-18.
99. Yang, X., Lennard, K. R., He, C., Walker, M. C., Ball, A. T., Doigneaux, C., Tavassoli, A., and van der Donk, W. A. (2018) A lanthipeptide library used to identify a protein–protein interaction inhibitor, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 375-380, doi: 10.1038/s41589-018-0008-5.
100. Nixon, A. E., Sexton, D. J., and Ladner, R. C. (2014) Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice, *MAbs*, **6**, 73-85, doi: 10.4161/mabs.27240.
101. Urban, J. H., Moosmeier, M. A., Aumuller, T., Thein, M., Bosma, T., et al. (2017) Phage display and selection of lanthipeptides on the carboxy-terminus of the gene-3 minor coat protein, *Nat. Commun.*, **8**, 1500, doi: 10.1038/s41467-017-01413-7.
102. Hetrick, K. J., Walker, M. C., and van der Donk, W. A. (2018) Development and application of yeast and phage display of diverse lanthipeptides, *ACS Cent. Sci.*, **4**, 458-467, doi: 10.1021/acscentsci.7b00581.
103. Convery, N., and Gadegaard, N. (2019) 30 years of microfluidics, *Micro and Nano Engineering*, **2**, 76-91, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.003.
104. Fallah-Araghi, A., Baret, J. C., Ryckelynck, M., and Griffiths, A. D. (2012) A completely in vitro ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution, *Lab. Chip.*, **12**, 882-891, doi: 10.1039/c2lc21035e.
105. Mahler, L., Wink, K., Beulig, R. J., Scherlach, K., Tovar, M., et al. (2018) Detection of antibiotics synthetized in microfluidic picolitre-droplets by various actinobacteria, *Sci. Rep.*, **8**, 13087, doi: 10.1038/s41598-018-31263-2.
106. Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Stepanova, A. V., Bobik, T. V., Mokrushina, Y. A., et al. (2017) Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2550-2555, doi: 10.1073/pnas.1621226114.

ENGINEERING ARTIFICIAL BIODIVERSITY OF LANTIBIOTICS TO EXPAND THE CHEMICAL SPACE OF DNA-ENCODED ANTIBIOTICS

Review

S. O. Pipiya[1], S. S. Terekhov[1,2], Yu. A. Mokrushina[1,2], V. D. Knorre[1], I. V. Smirnov[1,2]*, and A. G. Gabibov[1,2]

[1] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: smirnov@ibch.ru*

[2] *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received August 11, 2020
Revised September 28, 2020
Accepted October 7, 2020

The discovery of antibiotics was one of the fundamental stages in the development of humanity, leading to a dramatic increase in the life expectancy of millions of people all over the world. The uncontrolled use of antibiotics resulted in the selection of resistant strains of bacteria, limiting the effectiveness of antimicrobial therapy nowadays. Antimicrobial peptides (AMPs) were considered promising candidates for next-generation antibiotics for a long time. However, the practical application of AMPs is restricted by their low therapeutic indices, impaired pharmacokinetics, and pharmacodynamics, which is predetermined by their peptide structure. Nevertheless, the DNA-encoded nature of AMPs enables creating broad repertoires of artificial biodiversity of antibiotics, making them versatile templates for the directed evolution of antibiotic activity. Lantibiotics are a unique class of AMPs with an expanded chemical space. A variety of post-translational modifications, mechanisms of action on bacterial membranes, and DNA-encoded nature make them a convenient molecular template for creating highly representative libraries of antimicrobial compounds. Isolation of new drug candidates from this synthetic biodiversity is extremely attractive but requires high-throughput screening of antibiotic activity. The combination of synthetic biology and ultrahigh-throughput microfluidics allows implementing the concept of directed evolution of lantibiotics for accelerated creation of new promising drug candidates.

Keywords: directed evolution of antimicrobial activity, DNA-encoded antibiotics, ultrahigh-throughput screening, microfluidics, lantibiotic bioengineering, drug discovery, antibiotic resistance

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1569 – 1586

УДК 577.21

МЕТИЛИРОВАНИЕ рРНК И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Обзор

© 2020 И.А. Остерман[1,2], О.А. Донцова[1,2,3], П.В. Сергиев[1,2,4]*

[1] *Сколковский институт науки и технологии, Центр наук о жизни, 143028 Сколково, Россия; электронная почта: petya@genebee.msu.ru*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия*

[3] *Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

[4] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 12.06.2020
После доработки 16.07.2020
Принята к публикации 16.07.2020

Метилирование нуклеотидных остатков рРНК – один из основных механизмов устойчивости бактерий к действию ингибиторов синтеза белка. Гены необходимых для этого метилтрансфераз встречаются и у штаммов-продуцентов, и у клинических изолятов патогенных бактерий. В ряде случаев, напротив, метилирование рРНК ферментами «домашнего хозяйства» оказывается необходимым для активности антибиотиков. Известно как о кооперативности, так и о взаимоисключающем характере модификаций рРНК, так или иначе связанных с эффективностью антибиотиков. Интересно понимание эволюционных взаимоотношений систем модификации рРНК ферментами «домашнего хозяйства» и метилтрансфераз антибиотикорезистентности. Обсуждению всего этого спектра вопросов посвящен данный обзор.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, метилирование, антибиотики, трансляция, макролиды, аминогликозиды.

DOI: 10.31857/S0320972520110056

ВВЕДЕНИЕ

Один из основных механизмов действия антибиотиков – нарушение синтеза белка за счет связывания в функциональных центрах рибосомы – пептидилтрансферазном (ПТЦ) и декодирующем (ДЦ) центрах и пептидном туннеле (ПТ) [1]. В этих же центрах располагается большая часть модифицированных нуклеотидных остатков рибосомной РНК (рРНК) [2]. Известно, что метилирование участков связывания – это один из основных механизмов устойчивости к антибиотикам, действующим на рибосому. Подобное метилирование распространено как среди продуцентов этих антибактериальных агентов, так и среди патогенных бактерий, вызывающих инфекционные заболевания человека и животных. В то же время известно множество модифицированных нуклеотидных остатков рРНК, распространенных среди более широких групп бактерий и даже повсеместно, чье присутствие, на первый взгляд, не связано с антибиотиками. Однако среди подобного рода консервативно модифицированных, как правило, метилированных нуклеотидных остатков, встречаются те, что обеспечивают как умеренный уровень устойчивости, так и, наоборот, определяют чувствительность к антибиотикам, влияют на приспособленность к устойчивости (так называемые fitness cost) и служат эволюционным резервуаром для возникновения генов устойчивости. Данный обзор посвящен разным аспектам влияния метилирования рРНК на устойчивость к антибиотикам.

МЕТИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСТАТКОВ 23S рРНК, НАХОДЯЩИХСЯ В ПЕПТИДНОМ ТУННЕЛЕ

Пептидный туннель, через который проходят синтезируемые рибосомой белки, пронизывает большую субчастицу рибосомы от ПТЦ до про-

Принятые сокращения: ДЦ – декодирующий центр; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; ПТ – пептидный туннель; рРНК – рибосомная РНК.

* Адресат для корреспонденции.

тивоположной, так называемой цитоплазматической, стороны. С туннелем взаимодействуют как регуляторные пептидные последовательности, так и несколько классов антибиотиков [3]. Самым известным, а также наиболее значимым с точки зрения практической медицины случаем, когда метилирование вызывает устойчивость к антибиотикам, является диметилирование расположенного в ПТ нуклеотидого остатка A2058 23S рРНК (здесь и далее нумерация нуклеотидных остатков рРНК *Escherichia coli*) по N6 атому метилтрансферазами семейства Erm [4] (рис. 1, *а–в*; таблица). Эта модификация вызывает устойчивость к большой группе антибиотиков – макролидам, линкозамидам и стрептограмминам Б класса [4, 5]. Нуклеотидный остаток A2058 23S рРНК располагается в ПТ на небольшом расстоянии от ПТЦ и контактирует с антибиотиками этих трех классов. Диметилирование (а в случае линкозамидов – монометилирование) при помощи TlrD и нескольких родственных ферментов [5] нарушает связывание антибиотиков за счет неспособности образовать водородную связь с A2058 и перекрывания с метильной группой (рис. 1, *в*). Этот механизм устойчивости широко распространен среди продуцентов макролидов и патогенных штаммов, для борьбы с которыми используются эти антибиотики [6]. Предполагается, что источником распространения генов семейства *erm* среди бактерий, в том числе патогенных, был горизонтальный перенос генов от штаммов-продуцентов [7]. В то же время остает-

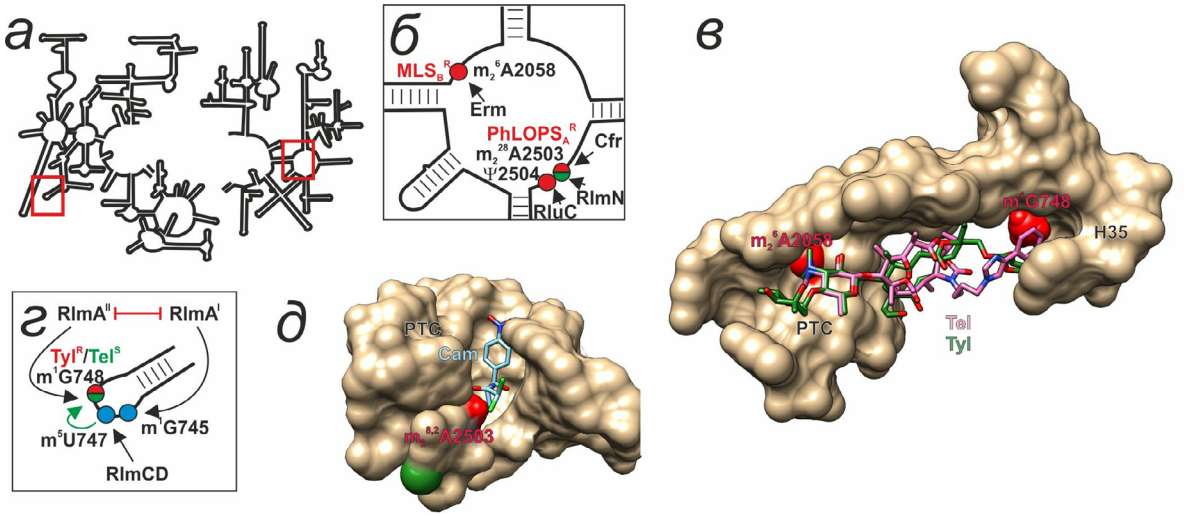


Рис. 1. Влияние модифицированных нуклеотидных остатков пептидного туннеля и ПТЦ на взаимодействие с антибиотиками. *а* – Схема вторичной структуры 23S рРНК. Красными прямоугольниками обозначены области, рассмотрению которых посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура участка V домена 23S рРНК, образующего часть ПТЦ и ПТ. Модифицированные нуклеотидные остатки, обсуждаемые в тексте, обозначены цветными кружками и подписаны. Красным выделены модификации устойчивости к антибиотикам (MLS_B^R – устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмминам Б; $PhLOPS_A^R$ – устойчивость к фениколам, линкозамидам, оксазалидинонам, плевромутилинам и стрептограмминам А), зеленым – модификация, способствующая связыванию антибиотиков. Стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. *в* – Пространственная структура участка рибосомы, образующего ПТ (показана в виде молекулярной поверхности), и связанных с рибосомой антибиотиков тилозина (показан зеленой проволочной моделью и подписан) и телитромицина (показан розовой проволочной моделью и подписан). Красными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы нуклеотидных остатков m^1G748 и m_2^6A2058 23S рРНК, перекрывающиеся с участком связывания тилозина и, в случае m_2^6A2058, телитромицина. Подписаны некоторые элементы вторичной структуры 23S рРНК. *г* – Вторичная структура спирали 35 23S рРНК, образующей часть ПТ. Модифицированные нуклеотидные остатки, обсуждаемые в тексте, обозначены цветными кружками и подписаны. Красным и зеленым выделена и подписана модификация, определяющая повышенную устойчивость к тилозину и чувствительность к телитромицину. Синими кружками показаны модификации ферментами «домашнего хозяйства». Черными стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. Зеленая стрелка обозначает стимулирующее влияние одной модификации на другую, а красная линия, заканчивающаяся чертой – взаимоисключающие модификации. *д* – Пространственная структура участка рибосомы, образующего ПТЦ (обозначен PTC) и связанный с рибосомой антибиотик хлорамфеникол (показан голубой проволочной моделью и подписан). Красными и зелеными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы, присоединенные к C2 и C8 атомам нуклеотидного остатка $m_2^{8,2}A2503$ 23S рРНК, препятствующие и способствующие связыванию хлорамфеникола и ряда других антибиотиков соответственно. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 1K9M [12], 4V7Z [13], 6ND5 [14]. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

ся открытым вопрос о происхождении предковых генов *erm* в самих штаммах-продуцентах. Поиск аминокислотных последовательностей, подобных белкам Erm, среди бактерий [8] однозначно приводит к идентификации универсально консервативной 16S рРНК метилтрансферазы RsmA(KsgA), как наиболее эволюционно близкой. Более того, специфичность RsmA(KsgA) может быть изменена на способность модифицировать субстрат Erm всего лишь с помощью замены двух петель [9]. Можно предположить, что m_2^6A1518/19 16S рРНК метилтрансфераза, также осуществляющая диметилирование остатков аденозина по экзоциклическому N6 атому, была предковым ферментом для эволюции устойчивости метилтрансфераз семейства Erm.

Почему же, в отличие от RsmA(KsgA), гены Erm-метилтрансфераз не распространились среди других таксономических групп организмов? По-видимому, дело во вредном влиянии модификации m_2^6A2058 23S рРНК на приспособленность клеток бактерий в отсутствие антибиотиков. Негативный эффект от метилирования, судя по всему, связан не с повышенными затратами на синтез метилтрансферазы, а с тем, что модифицированные рибосомы синтезируют белки в неоптимальных пропорциях за счет взаимодействия модифицированного A2058 с аминокислотными остатками растущего белка внутри ПТ [15]. Клетки, имеющие постоянно активную метилтрансферазу ErmC и соответственно диметилированный A2058, проигрывают конкуренцию тем, у которых модификации нет [15]. Именно этим, по-видимому, объясняется подавление экспрессии генов *erm* в отсутствие макролидов не только у большинства устойчивых штаммов, но даже у штамма-продуцента [16]. Наиболее распространенный механизм регуляции экспрессии генов *erm* связан с торможением рибосомы на короткой рамке считывания, расположенной перед геном метилтрансферазы [17–19], из-за чего инициаторный участок гена устойчивости становится доступным для связывания с другой рибосомой. Альтернативными регуляторными механизмами, позволяющими активировать гены семейства *erm* в присутствии антибиотиков, являются аттенюация транскрипции [20], использование специфичного транскрипционного фактора [21] или индуцируемый кетолидами сдвиг рамки считывания [22].

Метилирование нуклеотидого остатка G748 23S рРНК, также расположенного в туннеле большой субчастицы рибосомы (рис. 1, *а*, *в* и *г*) по N1 атому, в комбинации с монометилированием A2058 обеспечивает устойчивость бактерии-продуцента к 16-членному макролиду с объемными сахарными заместителями – тилозину [23], при этом модификации A2058 или G748 по отдельности недостаточно для обеспечения устойчивости. Формирование m^1G748 23S рРНК осуществляет метилтрансфераза $RlmA^{II}$ (TlrD), которая встречается у многих грамположительных бактерий, у грамотрицательных обычно присутствует ее гомолог $RlmA^{I}$, модифицирующий расположенный рядом нуклеотидный остаток G745 23S рРНК по N1 положению [24] (рис. 1, *г*; таблица) и относящийся к ферментам «домашнего хозяйства». Возможно, эти метилтрансферазы происходят от общего предка. Экспрессия гена метилтрансферазы *rlmA*^{II} *Bacillus subtilis* регулируется за счёт аттенюации транскрипции и трансляции, по всей видимости, чтобы минимизировать вредное влияние метилирования на приспособленность в отсутствие антибиотика [25], что делает спорным отнесение подобных ферментов к генам «домашнего хозяйства».

Любопытно, что для повышения устойчивости (MIC) *Streptococcus pneumoniae* с дважды метилированным A2058 к синтетическому производному эритромицина, телитромицину с 2 до 32 мкг/мл нужна не экспрессия, как в случае с тилозином, а инактивация гена *rlmA*^{II} и соответственно отсутствие метилирования G748 23S рРНК [26]. Эта особенность объясняется, по-видимому, тем, что участок связывания телитромицина не перекрывается с расположением метильной группы, а наоборот, расположен так, чтобы было возможно взаимодействие между модифицированным нуклеотидом и антибиотиком (рис. 1, *в*). Нуклеотидный остаток m^5U747 23S рРНК, образующийся посредством конститутивной метилтрансферазы RlmCD [27] (рис. 1, *г*) и соседствующий с G748, способствует узнаванию последнего метилтрансферазой $RlmA^{II}$ и, соответственно, косвенно способствует связыванию телитромицина [28].

Итак, на примере макролидов мы видим, что метилирование рРНК может приводить к устойчивости к антибиотикам за счёт перекрывания метильных групп с участком связывания антибиотика, а также к чувствительности к антибиотикам за счёт взаимодействия метильной группы с антибиотиком. Также на данном примере можно иллюстрировать взаимоисключающее филогенетическое распространение рРНК метилтрансфераз (*rlmA*^{I} и *rlmA*^{II}) и кооперативность в процессе модификации (RlmCD и $RlmA^{II}$).

МЕТИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСТАТКОВ 23S рРНК, НАХОДЯЩИХСЯ В ПТЦ

Пептидилтрансферазный центр – это главный ферментативный центр рибосомы, функ-

рРНК метилтрансферазы, активность которых влияет на устойчивость к антибиотикам

ID	Название	Продукт	Встречаемость	Отношение метилирования к антибиотикорезистентности	Механизм влияния на активность антибиотика	Предположительный предковый фермент*
P36999	$RlmA^{I}$	$m^{1}G745$	грамотрицательные бактерии	чувствительность: виомицин (умеренно)	предположительно конформационное изменение	$RlmA^{II}$**
Q9S1M6	$RlmA^{II}$	$m^{1}G748$	продуцент тилозина *Streptomyces roseoflavus*, другие грамположительные бактерии	устойчивость: тилозин чувствительность: телитромицин	непосредственное стерическое препятствие; гидрофобный контакт	$RlmA^{I}$**
P18644	TsnR	Am1067	продуцент тиострептона, *Streptomyces azureus*	устойчивость: тиострептон	непосредственное стерическое препятствие	TrmH, RlmB
P9WJ63	TlyA	Cm1920 (а также Cm1409 16S рРНК)	патоген *Mycobacterium tuberculosis* и некоторые другие бактерии	чувствительность: капреомицин, виомицин	предположительно гидрофобный контакт или конформационное изменение	
P13956	Erm семейство	$m_2^{6}A2058$ 23S рРНК	множество продуцентов и патогенов	устойчивость: макролиды, линкозамиды, стрептограммины Б	непосредственное стерическое препятствие	RsmA(KsgA)
P97178	TlrD	$m^{6}A2058$ 23S рРНК	продуцент тилозина *Streptomyces roseoflavus*, другие продуценты	устойчивость: линкозамиды, макролиды (умеренно)	непосредственное стерическое препятствие	RsmA(KsgA)
Q9FBG4	Cfr	$m^{8}A2503$	патоген *Staphylococcus sciuri* и другие	устойчивость: фенико-лы, линкозамиды, оксазалидиноны, плевромутилины, стрептограммины А	непосредственное стерическое препятствие	RlmN
P36979	RlmN	$m^{2}A2503$	у всех бактерий	чувствительность: линезалид, спарсомицин, тиамулин (умеренно)	предположительно конформационное изменение	
Q9F5K6	AviRb	Um2479	продуцент авиламицина *Streptomyces viridochromogenes*	устойчивость: авиламицин	непосредственное стерическое препятствие	TrmH, RlmB
Q93CQ2	EmtA	mG2470	патоген *Enterococcus faecium* и другие	устойчивость: виламицин, эверниамицин	непосредственное стерическое препятствие	THUMPD3, RlmKL, Trm14
Q9F5K5	AviRa	mG2535	продуцент авиламицина, *Streptomyces viridochromogenes*	устойчивость: авиламицин (умеренно)	непосредственное стерическое препятствие	
P0A6U5	RsmG	$m^{7}G527$	у всех бактерий	чувствительность: стрептомицин (умеренно)	неизвестно	
неизвестно	Pct	$m^{1}A964$	продуцент пактамицина *Streptomyces pactum*	устойчивость: пактамицин	непосредственное стерическое препятствие	

Окончание таблицы

ID	Название	Продукт	Встречаемость	Отношение метилирования к антибиотикорезистентности	Механизм влияния на активность антибиотика	Предположительный предковый фермент*
P0ADX9	RsmD	m^2G966	у всех бактерий	устойчивость: тетрациклин (умеренно) чувствительность: тигециклин (умеренно)	неизвестно	
E9KIK3	EfmM	m^5C1404	патоген *E. faecium*	устойчивость: канамицин, тобрамицин (умеренно)		RsmF
Q6F5A0	ArmA	m^7G1405	патоген *Klebsiella pneumoniae* и другие	устойчивость: аминогликозиды с 4-6 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	
Q33DX5	RmtA-H	m^7G1405	патоген *Pseudomonas aeruginosa* и другие	устойчивость: аминогликозиды с 4-6 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	
Q53316	KgmB и другие	m^7G1405	продуцент небрамицина *Streptomyces tenebrarius* и другие	устойчивость: аминогликозиды с 4-6 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	
A8C927	NpmA	m^1A1408	патоген *Escherichia coli*	устойчивость: аминогликозиды с 4-6 и 4-5 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	TrmB
P25920	KamB	m^1A1408	Продуцент тобрамицина *S. tenebrarius*	устойчивость: аминогликозиды с 4-6 и 4-5 замещенным дезоксистрептамином	непосредственное стерическое препятствие	TrmB
A6YEH1	CmnU	m^1A1408	продуцент капреомицина *Streptomyces capreolus*	устойчивость: капреомицин	непосредственное стерическое препятствие	TrmB
P9WJ63	TlyA	Cm1409 (а также Cm1920 23S рРНК)	патоген *Mycobacterium tuberculosis* и некоторые другие бактерии	чувствительность: капреомицин, виомицин	предположительно гидрофобный контакт или конформационное изменение	
P0AGL7	RsmE	m^3U1498	у всех бактерий	чувствительность: аминогликозиды с 4-6 и 4-5 замещенным дезоксистрептамином (умеренно)	предположительно конформационное изменение	
P06992	RsmA (KsgA)	$m_2^6A1518/19$	у всех организмов	чувствительность: касугамицин	конформационное изменение	

* Сходство аминокислотных последовательностей определяли с помощью программы Blast [8].
** $RlmA^I$ и $RlmA^{II}$ являются паралогами, присутствующими у грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно.

ция которого заключается в полимеризации присоединенных к тРНК аминокислот. ПТЦ содержит множество нуклеотидных остатков, модифицированных ферментами «домашнего хозяйства» [2], а также нуклеотидные остатки, модификация которых влияет на устойчивость к антибиотикам. Так, модификация нуклеотидного остатка A2503 23S рРНК (рис. 1, *б* и *д*) блоки-

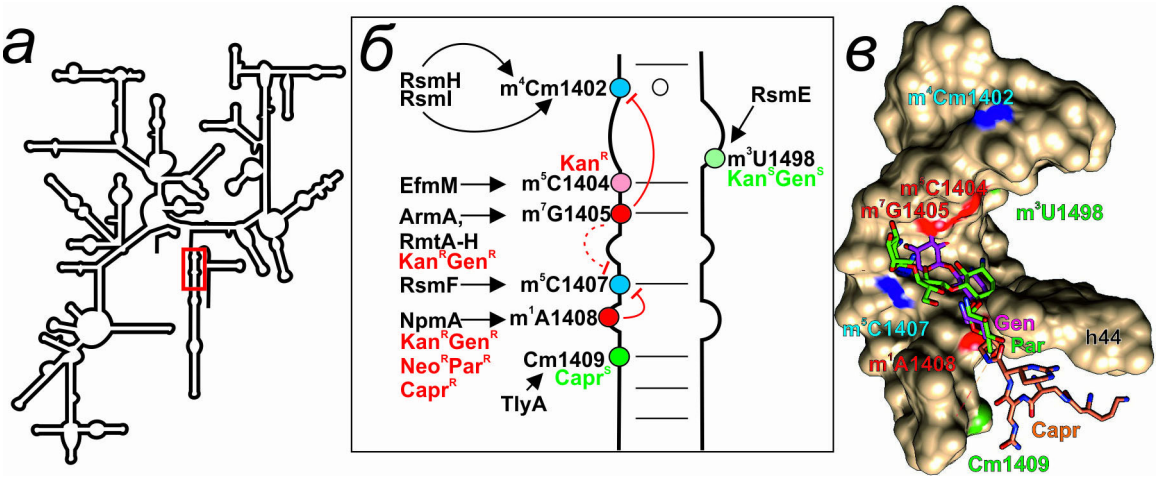


Рис. 2. Влияние модифицированных нуклеотидных остатков ДЦ 16S рРНК на взаимодействие с антибиотиками. *а* – Схема вторичной структуры 16S рРНК. Красным прямоугольником обозначена область, рассмотрению которой посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура участка спирали 44 16S рРНК, образующей часть ДЦ. Модифицированные нуклеотидные остатки, обсуждаемые в тексте обозначены цветными кружками и подписаны. Красным выделены модификации устойчивости к антибиотикам (Kan^RGen^R – устойчивость к канамицину и гентамицину, аминогликозидам, содержащим 4-6 замещенный остаток дезоксистрептамина; Neo^RPar^R – устойчивость к неомицину и паромомицину, аминогликозидам, содержащим 4-5 замещенный остаток дезоксистрептамина; $Capr^R$ – устойчивость к капреомицину), а зеленым – модификации, способствующие связыванию антибиотиков (подписи соответствуют антибиотикам). Синими кружками показаны модификации ферментами «домашнего хозяйства». Стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. Красные линии, заканчивающаяся чертой – ингибирующее влияние модификаций друг на друга. Пунктирная красная черта – влияние, поставленное под сомнение. *в* – Пространственная структура участка спирали 44 16S рРНК, образующей часть ДЦ (показана в виде молекулярной поверхности), и связанных с рибосомой антибиотиков гентамицина (4-6 замещенный аминогликозид, показан розовой проволочной моделью и подписан), паромомицина (4-5 замещенный аминогликозид, показан зеленой проволочной моделью и подписан) и капреомицина (показан оранжевой проволочной моделью и подписан). Красными, зелеными и синими Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы нуклеотидных остатков, препятствующих, способствующих, а также не влияющих на связывание антибиотиков. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 4V53 [51], 4V7M [52] и 4V51 [53]

рует связывание сразу нескольких классов антибиотиков. Метилирование по C8 атому метилтрансферазой Cfr делает клетки устойчивыми к действию фениколов, линкозамидов, оксазалидинонов, плевромутилинов и стрептограмминов класса A [29]. Удивительно, что несмотря на широкое распространение гена *cfr* среди грамположительных и грамотрицательных бактерий, он не встречается у продуцентов антибиотиков. Эта модификация не стала постоянной у всех бактерий. Логично было бы предположить, что она оказывает отрицательный эффект на жизнедеятельность, однако на данный момент получены данные, свидетельствующие об очень небольшом замедлении роста бактерий при экспрессии *cfr* [30]. Экспрессия гена *cfr* изучена не настолько подробно, как генов *erm*, но в одном из обнаруженных патогенных штаммов *Staphylococcus aureus* рамке *cfr* предшествует небольшая, возможно, регуляторная рамка считывания. В другом случае гену *cfr* предшествует ген *ermB*, а промотор их общего оперона индуцируется эритромицином, что вызывает устойчивость сразу к 7 классам антибиотиков [31].

Кроме Cfr, на нуклеотидный остаток A2503 23S рРНК также действует повсеместно распространенная метилтрансфераза «домашнего хозяйства» RlmN, присоединяющая метильную группу к атому C2 [32]. В отсутствие данного метилирования возникает не чувствительность, а небольшой уровень устойчивости к линезолиду [33]. Тем не менее приобретение умеренной устойчивости к антибиотикам в отсутствие этого метилирования, по-видимому, не перевешивает его пользы для функционирования рибосом. Клетки, лишенные метилтрансферазы RlmN, не способны поддерживать высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков, а также демонстрируют умеренное увеличение количества интермедиатов сборки рибосомных субчастиц в случае культивирования при 20 °C [34]. Любопытно, что в клетках, лишенных модификации A2503 по C2 положению слабее происходит индукция экспрессии гена метилтрансфера-

зы *ermC*, что указывает на возможное взаимодействие этого модифицированного нуклеотидного остатка с растущим пептидом и его участие в регуляции синтеза белка [35].

Эволюционное происхождение гена *cfr* вызывает споры. Так, поиск родственных последовательностей позволяет говорить о родстве Cfr и RlmN, причем Cfr, как предполагается, произошел от RlmN, возможно, по эволюционной траектории, проходящей через гены РНК метилтрансфераз пластид [36]. В пользу общности происхождения этих ферментов говорит как то, что они модифицируют один и тот же нуклеотидный остаток, так и то, что они имеют одинаковый и довольно малораспространенный радикальный механизм метилирования [37, 38]. Тем не менее в других работах [39, 40] высказывается идея, что Cfr произошла от метилтрансферазы клостридий, родственной RlmN, однако имеющей другой субстрат, нежели A2503 23S рРНК. Учитывая, что RlmN проявляет двойную специфичность, будучи способной метилировать тРНК [41], можно предположить, что родственные RlmN и Cfr метилтрансферазы клостридий могут иметь не рРНК, а исключительно тРНК субстрат [39].

Только одна из довольно широко распространенных модификаций нуклеотидных остатков ПТЦ приводит к повышению устойчивости к антибиотикам, т.е. является своего рода конститутивной модификацией устойчивости. Это псевдоуридинилирование нуклеотидного остатка U2504 при помощи фермента RluC [42], которое повышает устойчивость к действию тиамулина, клиндамицина и линезолида и, в меньшей степени, к действию хлорамфеникола, гигромицина A и спарсомицина [43]. Несмотря на то что RluC превращает сразу три уридина в псевдоуридины (955, 2504 и 2580), именно Ψ2504 (рис. 1, *б*) повышает устойчивость к перечисленным ингибиторам пептидилтрансферазной реакции.

Суммируя данный раздел, можно говорить как об эволюционировании рРНК метилтрансферазы устойчивости (Cfr) из конститутивной рРНК/тРНК метилтрансферазы (RlmN), так и о возможном превращении псевдоуридинсинтазы устойчивости в конститутивный модифицирующий фермент «домашнего хозяйства» (RluC).

МЕТИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ОСТАТКОВ 16S рРНК, НАХОДЯЩИХСЯ В ДЦ

Второй важнейший функциональный центр рибосомы – декодирующий. Он расположен на малой субчастице и образован, по большей части, спиралью 44 16S рРНК. Множество антибиотиков, в основном принадлежащих классу аминогликозидов, взаимодействует с этим участком рибосомы и вызывает ошибки декодирования [44], а также препятствует транслокации [45]. Устойчивость к аминогликозидам может возникнуть за счет метилирования нуклеотидных остатков ДЦ G1405 16S рРНК по N7 атому и A1408 16S рРНК по атому N1 [46] (рис. 2; таблица). Ферменты, способные осуществлять эти модификации, встречаются и у штаммов-продуцентов аминогликозидов, и у патогенных бактерий, куда они попали, скорее всего, в результате горизонтального переноса генов [46]. Так, m^7G1405 образуется в рибосомах продуцентов аминогликозидов, содержащих 4-6 замещенный дезоксистрептамин, при помощи большого семейства сходных по структуре метилтрансфераз KgmB, Sgm, FmrO, GrmA, GrmB, GrmO, Kmr, NbrB и Srm1 [47]. Весьма широко распространены N7 метилтрансферазы ArmA и RmtA-H, приводящие к образованию нуклеотидного остатка m^7G1405 16S рРНК у патогенных бактерий [48] и вызывающие устойчивость к аминогликозидам, содержащим 4-6 замещенный дезоксистрептамин, таким как канамицин и гентамицин (рис. 2, *б* и *в*; см. расположение гентамицина на панели *в*, показан розовым, и нуклеотидного остатка m^7G1405 16S рРНК) [46]. Модификация m^1A1408 16S рРНК приводит к устойчивости к более широкому спектру аминогликозидов, а именно содержащих как 4-6, так и 4-5 замещенный дезоксистрептамин, таким как неомицин и паромомицин (рис. 2, *б* и *в*; сравните расположение гентамицина и паромомицина на панели *в*, показаны розовым и зеленым соответственно, и нуклеотидного остатка m^1A1408 16S рРНК). Эти метилтрансферазы встречаются у продуцентов аминогликозидов (KamA, KamB и KamC) и не родственного аминогликозидам противотуберкулезного антибиотика капреомицина (CmnU) [47]. Долгое время считалось, что у патогенных бактерий такого рода устойчивости нет, однако в 2007 г. у патогенной *Escherichia coli* была обнаружена подобная N1 A1408 метилтрансфераза NpmA [49]. Метилтрансферазы, модифицирующие N1 атом нуклеотидного остатка A1408, по-видимому, родственны между собой, как можно понять из сходства их аминокислотных последовательностей. Эволюционное происхождение всего этого семейства ферментов не вполне ясно. Возможно, оно произошло от тРНК-специфичной гуанин N7 метилтрансферазы TrmB [50].

Еще один механизм устойчивости к аминогликозидам (канамицину и тобрамицину, но не

гентамицину) связан с метилированием нуклеотидного остатка C1404 16S рРНК по C5 атому [54], осуществляемым метилтрансферазой EfmM, обнаруженной у патогенного штамма *Enterococcus faecium*. Этот белок похож на метилтрансферазу RsmF, от которой, возможно, происходит. Любопытно, что у *Thermus thermophilus* метилтрансфераза RsmF модифицирует сразу три нуклеотидных остатка C1400, C1404 и C1407 [55], свидетельствуя о достаточно легком эволюционировании субстратной специфичности подобных ферментов. Модификация m^5C1404 располагается в непосредственной близости от сайта связывания канамицина [56], однако не перекрывается с ним, исключая стерическое препятствие, как механизм устойчивости. Об этом говорит также небольшая, 12-кратная, в случае экспрессии *efmM* в *E. coli*, разница в минимальной ингибирующей концентрации в присутствии и в отсутствие антибиотика. Удивительно, что связывание гентамицина, имеющего более объемную метиламиногруппу вместо незамещенной аминогруппы канамицина в месте контакта с метильной группой m^5C1404, не нарушается в результате этого метилирования 16S рРНК. В научной литературе устойчивость к канамицину и тобрамицину, вызванную метилированием m^5C1404 [54], связывают с вытеснением воды, взаимодействующей с антибиотиком. В случае гентамицина, наоборот, образование m^5C1404 16S рРНК приводит к возникновению дополнительного гидрофобного контакта (рис. 2, *б* и *в*; см. расположение гентамицина на панели *в*, показан розовым, и нуклеотидного остатка m^5C1404 16S рРНК).

Гидрофобным контактом может объясняться и взаимодействие капреомицина, антибиотика, используемого для борьбы с туберкулезом, с 2′-OMe-группой Cm1409 [57]. У некоторых патогенных бактерий, включая *Mycobacterium* sp., *Campylobacter jejuni* и *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, была обнаружена метилтрансфераза TlyA, отвечающая за модификацию нуклеотидных остатков C1409 16S и C1920 23S рРНК по 2′-OH-группе [58, 59]. Делеция или мутация гена *tlyA* у *Mycobacterium* sp. приводила к появлению устойчивости к капреомицину. При образовании мостика B2a между рибосомными субчастицами нуклеотидные остатки C1409 и C1920 оказываются сближенными. Структурные исследования показали, что здесь же располагаются и туберактиномицины – виомицин и капреомицин [52]. Метилирование обеих субчастиц делает рибосому более чувствительной к этим антибиотикам [59]. Кроме предположительного гидрофобного контакта Cm1409 с капреомицином (рис. 2, *б* и *в*; см. расположение капреомицина на панели *в*, показан оранжевым, и нуклеотидного остатка Cm1409 16S рРНК), повышенная чувствительность к этому антибиотику рибосом, модифицированных TlyA, может объясняться изменением подвижности субчастиц друг относительно друга во время транслокации, так как туберактиномицины действуют именно на эту стадию работы рибосомы [60]. В ходе исследования ортологов гена *tlyA* оказалось, что есть два варианта этого белка – $TlyA^{I}$, который модифицирует только C1920 23S рРНК и $TlyA^{II}$, метилирующий нуклеотидные остатки обеих субчастиц. Экспрессия гена, кодирующего $TlyA^{II}$ в клетках *E. coli*, делает их более чувствительными к туберактиномицинам, но при этом не дает никакого преимущества при культивировании в отсутствие антибиотика [61]. В чем причина наличия гена *tlyA* у патогенных бактерий, если он приводит к увеличению чувствительности к антибиотикам? Возможно, белок TlyA обладает дополнительной функцией, кроме модификации рРНК. Было показано, что рекомбинантный белок TlyA проявляет гемолитическую активность *in vitro*, а при экспрессии его гена в *E. coli* присутствие этого белка было детектировано в мембране клетки [62]. На примере *C. jejuni* было показано, что наличие гена *tlyA* обусловливает вирулентность, причем мутации, подавляющие ферментативную активность TlyA, оказывают такой же эффект, как и удаление гена целиком. Значит именно метилирование вносит вклад в патогенность [58]. Несмотря на близость нуклеотидных остатков-мишеней TlyA к сайту связывания аминогликозидов, наличие или отсутствие этой метилтрансферазы никак не сказывается на эффективности действия аминогликозида амикацина. В то же время мутация расположенного рядом с сайтом метилирования нуклеотидного остатка A1408G обеспечивает устойчивость и к амикацину, и к капреомицину [63]. Интересно, что инактивация гена *tlyA* практически не сказывается на скорости роста бактерий без мутаций в рРНК, в то время как экспрессия *tlyA* повышает приспособленность бактерий с мутацией A1408G, что является весьма необычным типом взаимодействия метилирования и антибиотикорезистентности [63]. В данном случае можно говорить о том, что метилирование понижает фенотипическую стоимость устойчивости к антибиотикам, вызванной мутацией гена рРНК.

У продуцента капреомицина *Saccharothrix mutabilis* subsp. *Capreolus* был обнаружен ген, обеспечивающий защиту от собственного токсического продукта, *cmnU*, кодирующий гомолог метилтрансфераз, модифицирующих A1408 [64]. В случае идентичности продуктов метили-

рования устойчивость к капреомицину можно объяснить стерическим препятствием к связыванию (рис. 2, *б* и *в*; см. расположение капреомицина на панели *в*, показан оранжевым, и нуклеотидного остатка m^1A1408 16S рРНК).

В ДЦ есть еще одна модификация, отсутствие которой у *Mycobacterium smegmatis* приводит к устойчивости к аминогликозидам. Это метилирование U1498 16S рРНК по N3 атому (рис. 2) [65], осуществляемое метилтрансферазой «домашнего хозяйства» RsmE [66]. Надо заметить, что уровень устойчивости изменяется примерно в 2 раза, что может быть объяснено косвенными причинами. Отсутствие данной модификации также не сильно сказывается на жизнедеятельности клеток в отсутствие антибиотика [66].

Чрезвычайно интересным является взаимоисключающее образование некоторых метилированных нуклеотидных остатков, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, и конститутивно метилируемых нуклеотидных остатков (рис. 2, *б*). Метилирование G1405 по N7 атому метилтрансферазой RmtC, обнаруженной у патогенной *E. coli*, снижает активность метилтрансферазы «домашнего хозяйства» RsmF, модифицирующей C1407 по C5 положению [67]. Фенотипическая «цена» метилирования G1405 метилтрансферазой RmtC практически отсутствует [68]. Инактивация гена *rsmF* немного замедляет скорость роста бактерий, не приводя к дефектам сборки рибосом [31], однако без этой метилтрансферазы значительно снижается способность клеток конкурировать с клетками дикого типа [67, 68], а устойчивость к аминогликозидам возрастает [68]. Позже это наблюдение было взято под сомнение, поскольку было показано, что родственная метилтрансфераза ArmA, модифицирующая тот же G1405 по N7 положению, блокирует активность не RsmF, а другой метилтрансферазы «домашнего хозяйства», RsmI [69], модифицирующей 2′-OH нуклеотидного остатка C1402 [70]. Отсутствие метилирования Cm1402 может лишь частично объяснять значительное падение приспособленности бактерий, экспрессирующих *armA* в отсутствие антибиотиков [69], поскольку известно, что инактивация RsmI приводит к небольшому возрастанию частоты +1 и −1 сдвигов рамки считывания без сильного влияния на скорость роста бактерий [70].

Антагонизм модификации нуклеотидных остатков Cm1402 и m^7G1405 16S рРНК наблюдался также у *Pseudomonas aeruginosa*, у которой в норме отсутствует ген метилтрансферазы RsmF. У этой бактерии метилтрансфераза RmtD, образующая m^7G1405, также предотвращала модификацию Cm1402 ферментом RsmI. В свою очередь, оказалось, что активность RsmF, формирующая m^5C1407 16S рРНК, подавляется ферментом NpmA, метилирующим A1408 по N1 положению [69]. Экспрессия *npmA* не так значительно, как *armA*, сказывается на приспособленности клеток [69]. Гены, модифицирующие G1405 и A1408, встречаются и у штаммов-продуцентов аминогликозидов, и у патогенов, однако их экспрессия имеет разные последствия для эффективности роста. В отсутствие антибиотика штаммы патогенных бактерий с экспрессией генов метилтрансфераз устойчивости полностью пропадают при конкурентом культивировании, а в случае продуцентов антибиотиков экспрессия генов метилтрансфераз не оказывает столь отрицательного влияния на приспособленность [71].

Таким образом, из анализа метилирования ДЦ можно сделать несколько интересных выводов. Например, о крайне необычных взаимоисключающих взаимодействиях метилтрансфераз устойчивости и «домашнего хозяйства», а также о возможности ухудшать связывание антибиотика без перекрывания положений метильной группы и самого соединения, влияя на контакты, опосредованные водой. Также обращает на себя внимание положительная роль метилирования Cm1409 в связывании капреомицина, по-видимому, за счёт гидрофобного контакта.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ДРУГИМ АНТИБИОТИКАМ ЗА СЧЁТ МЕТИЛИРОВАНИЯ, СТЕРИЧЕСКИ ПРЕПЯТСТВУЮЩЕГО СВЯЗЫВАНИЮ

Помимо рассмотренных ранее примеров, когда метилирование рРНК вызывает устойчивость к антибиотикам, связывающимся в пептидном туннеле, пептидилтрансферазном центре и декодирующем центре, имеется ряд случаев, когда метилирование рРНК дает устойчивость к антибиотикам, связывающимся вне этих функциональных центров. Это, как правило, модификации рибосом продуцентов, защищающие свои рибосомы от производимого самой бактерией соединения.

Метилирование нуклеотидного остатка A1067 23S рРНК по 2′-OH-группе рибозы (рис. 3, *а* и *б*; таблица) даёт устойчивость к тиострептону и микрококцину [72]. Ген устойчивости, *tsnR*, в природе был обнаружен только у продуцентов тиострептона, например у штамма *Streptomyces azureus*. Оказалось, что метилтрансферза TsnR модифицирует свободную 23S рРНК, а в присут-

ствии тиострептона или рибосомного белка L11 модификация не происходит [73]. Структура комплекса тиострептона и 50S субчастицы *Deinococcus radiodurans* (рис. 3, *в*) иллюстрирует механизм устойчивости – метилирование рибозы A1067 препятствует сближению петли 1 антибиотика и спирали H43 [74]. Основное преимущество данного антибиотика заключается в том, что он связывается вдалеке от большинства других ингибиторов синтеза белка и не демонстрирует перекрестной устойчивости с другими антибиотиками. Данных о влиянии этой модификации на приспособленность нет, но показано, что рибосомы с модификацией и без одинаково обеспечивают GTPазную активность фактора EF-G [75].

В кластере биосинтеза авиламицина, обнаруженного в геноме *Streptomyces viridochromogenes Tü57*, закодированы гены двух метилтрансфераз, *aviRa* и *aviRb*, экспрессия которых обеспечивает устойчивость к действию этого антибиотика, при этом экспрессия *aviRa* в *Streptomyces lividans TK66* обеспечивает незначительный уровень устойчивости (10 мкг/мл), а *aviRb* – значительный (250 мкг/мл) [77]. Оказалось, что обе метилтрансферазы модифицируют нуклеотидные остат-

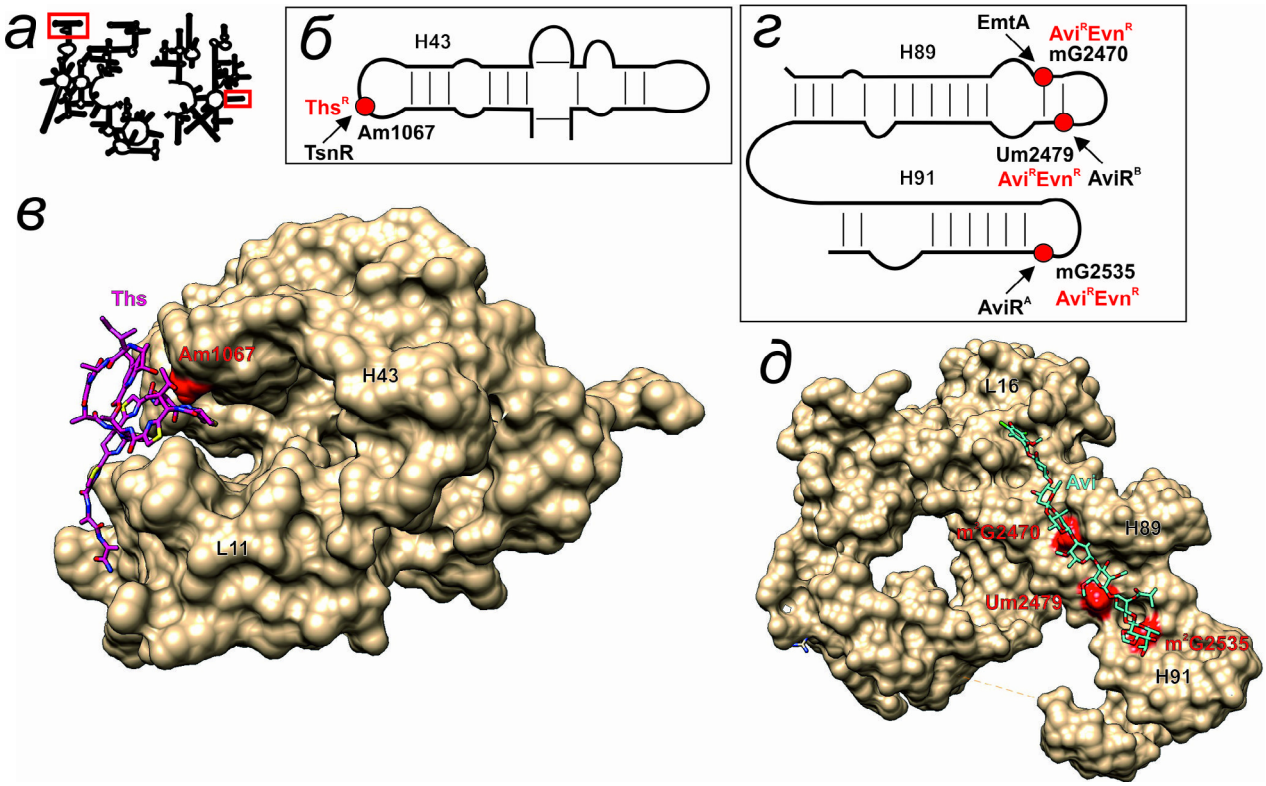


Рис. 3. Влияние модифицированных нуклеотидных остатков 23S рРНК на взаимодействие с тиострептоном и ортозомицинами. *а* – Схема вторичной структуры 23S рРНК. Красными прямоугольниками обозначены области, рассмотрению которых посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура участка II домена 23S рРНК, взаимодействующего с факторами трансляции GTPазы. Нуклеотидный остаток Am1067 23S рРНК, метилирование которого приводит к устойчивости к тиострептону (Ths^R), выделен красным кружком. Стрелкой показана активность модифицирующего фермента TsnR (подписан). *в* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде молекулярной поверхности), образующего участок связывания тиострептона (показан розовой проволочной моделью и подписан). Красными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показана метильная группа нуклеотидного остатка Am1067 23S рРНК, перекрывающаяся с участком связывания тиострептона. Подписаны спираль 43 23S рРНК и белок L11. *г* – Вторичная структура спиралей 89 и 91 23S рРНК, образующих участок связывания ортозомицинов. Модифицированные нуклеотидные остатки, вызывающие устойчивость к эвернимицину (Evn^R) и авиламицину (Avi^R), обозначены красными кружками и подписаны. Черными стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. *д* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде молекулярной поверхности), образующего участок связывания ортозомицинов (авиламицин показан голубой проволочной моделью и подписан). Красными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показаны метильные группы нуклеотидных остатков (подписаны), перекрывающиеся с участком связывания авиламицина. Подписаны спирали 89 и 91 23S рРНК и белок L16. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 3CF5 [74] и 5KCR [76]

ки в рРНК: AviR[a] – G2535 по N1 или N2 положению (предположено исходя из данных по остановке обратной транскриптазы), а AviR[b] – U2479 по 2′-OH-положению рибозы [78] (рис. 3, *г*; таблица). Устойчивость к авиламицину и родственному эверниамицину может быть также обеспечена за счет модификации G2470 метилтрансферазой EmtA (минимальная ингибирующая концентрация больше 256 мкг/мл) [79], обнаруженной на плазмиде у патогенной бактерии *E. faecium*. Структура комплекса авиламицина и эверниамицина с рибосомой *E. coli*, полученная методом криоэлектронной микроскопии, объясняет эффекты метилирования (рис. 3, *д*). Метильная группа, будучи присоединенной к 2′-OH U2479, перекрывается с участком связывания антибиотика. Точное положение метильных групп, присоединяемых к G2535 и G2470, не определено, но исходя из того, что данные модификации обеспечивают устойчивость и блокируют обратную транскрипцию, можно предположить, что модификация проходит по N1 или N2 атомам. Исходя из структуры комплекса авиламицина с рибосомой [76] можно предположить, что для перекрывания метильных групп, присоединяемых как AviR[a], так и EmtA, с антибиотиками этой группы метилированию должна подвергаться N2 аминогруппа. Об этом говорит и то, что Blast-поиск ферментов, схожих по последовательности с EmtA, позволяет идентифицировать возможное родство этого белка с гуанин-N2 РНК метилтрансферазами. О влиянии этих модификаций на эффективность роста бактерий в отсутствие антибиотиков на данный момент нет информации.

У продуцента пактомицина *Streptomyces pactum* метилирование A964 16S по N1 положению (таблица) обеспечивает устойчивость за счет ингибирования связывания этого антибиотика [80]. При этом мутации устойчивости к пактомицину A694G, C795U и C796U [81] располагаются в непосредственной близости от сайта связывания, определенного при помощи рентгеноструктурного анализа [82]. О роли метилирования A964 на эффективность роста на данный момент нет данных, в непосредственной близости расположены нуклеотидные остатки G966 и C967, модифицируемые метилтрансферазами «домашнего хозяйства» RsmD [83] и RsmB [84, 85] соответственно, участвующие в контроле соотношения скорости транскрипции и трансляции [86]. Неизвестно пока и о возможных функциональных взаимосвязях между модификацией A964 и соседних нуклеотидных остатков.

Из данного раздела можно сделать самый тривиальный вывод: где бы ни связывался антибиотик, даже вдали от тех участков, в которых часто встречаются метилированные нуклеотидные остатки, присоединенные ферментами «домашнего хозяйства», устойчивость к нему может быть обеспечена метилированием рРНК.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ЗА СЧЕТ ОТСУТСТВИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Помимо устойчивости к антибиотикам, вызванной стерическими препятствиями из-за внесения в участок связывания дополнительной метильной группы рРНК метилтрансферазами, существует несколько прямо противоположных примеров (рис. 4; таблица). Наиболее известный из них – это устойчивость к касугамицину при отсутствии диметилирования нуклеотидных остатков A1518 и A1519 16S рРНК (рис. 4, *а* и *б*; таблица) по N6 положению [87]. Структура комплекса касугамицина с рибосомой (рис. 4, *в*) показала, что нуклеотидные остатки A1518/19 не контактируют с антибиотиком, поэтому наличие или отсутствие метильных групп вряд ли может напрямую влиять на связывание антибиотика, например, создавая гидрофобный контакт [88]. Позже эксперименты подтвердили возможность взаимодействия касугамицина с рибосомами, лишенными метилирования нуклеотидных остатков A1518/19 16S рРНК [89]. Несмотря на то что без метилирования A1518/19 клетки становятся устойчивыми к касугамицину и таким образом имеют определенное преимущество хотя бы в специфических условиях наличия в среде этого антибиотика, практически все про- и эукариоты имеют ортологичные метилтрансферазы. Структура рибосомы с немодифицированными A1518/19 показала, что метилирование необходимо для формирования структуры ДЦ малой субчастицы (рис. 4, *в*, сравните структуру нескольких спиралей 16S рРНК в рибосомах, содержащих (зеленый) и не содержащих (красный) метильные группы, вносимые RsmA(KsgA)) [90]. По всей видимости, именно изменение структуры 30S субчастицы и является причиной устойчивости к касугамицину при инактивации гена *rsmA*(*ksgA*). Помимо этого, метилтрансфераза RsmA(KsgA) участвует в биогенезе 30S субчастицы как белок-переключатель [91]. Бактерии, лишенные этой метилтрансферазы, показывают сниженную скорость роста, а *Yersinia pestis* без RsmA(KsgA) проявляют меньшую вирулентность [92].

В отличие от большинства аминогликозидов, устойчивость к стрептомицину не может возникнуть за счет метилирования нуклеотидных остатков спирали 44 16S рРНК из-за отличающегося места связывания (рис. 4, *д*). Однако

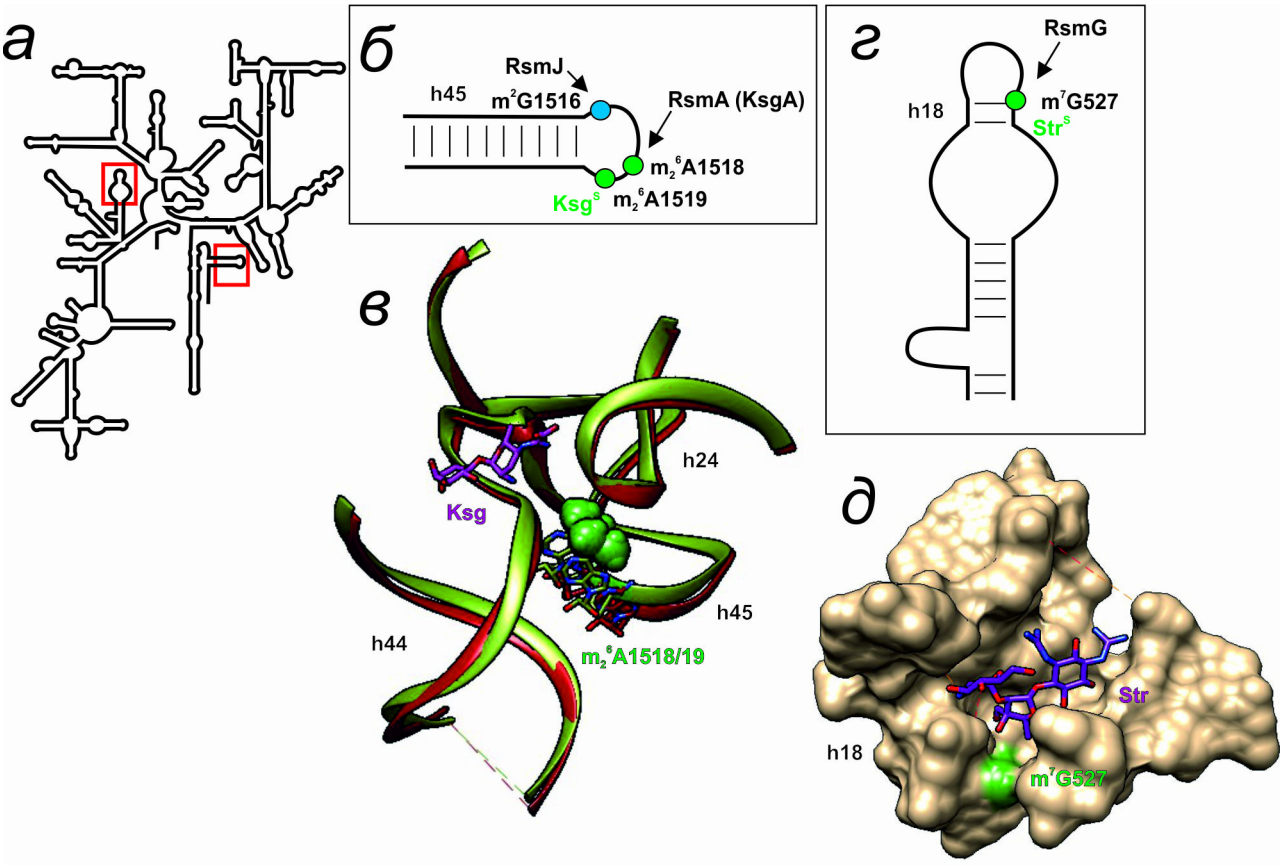


Рис. 4. Влияние модифицированных нуклеотидных остатков 16S рРНК на взаимодействие с касугамицином и стрептомицином. *а* – Схема вторичной структуры 16S рРНК. Красными прямоугольниками обозначены области, рассмотрению которых посвящены другие панели рисунка. *б* – Вторичная структура спирали 45 16S рРНК. Модифицированные нуклеотидные остатки обозначены цветными кружками и подписаны. Зеленым выделены модификации, способствующие связыванию касугамицина, а синим – модификация ферментом «домашнего хозяйства», не влияющим на активность антибиотика. Стрелками показана активность модифицирующих ферментов (подписаны), направленная на соответствующие нуклеотидные остатки. *в* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде трубчатой модели, спирали 16S рРНК подписаны), конформация которого зависит от метилированных нуклеотидных остатков m_2^6A1518/19. Зеленым показана структура, соответствующая рибосомам, содержащим метилированные, а красным – неметилированные нуклеотидные остатки A1518/19 (показаны проволочной моделью соответствующих цветов и подписаны, метильные группы показаны зелеными Ван-дер-Ваальсовыми сферами). Касугамицин, взаимодействующий с рибосомой, содержащей метилированные нуклеотидные остатки, показан розовой проволочной моделью и подписан. *г* – Вторичная структура спирали 18 16S рРНК, участвующей в образовании участка связывания стрептомицина. Нуклеотидный остаток m^7G527, модификация которого способствует активности стрептомицина, обозначен зеленым кружком и подписан. Черной стрелкой показана активность модифицирующего его фермента RsmG (подписан). *д* – Пространственная структура участка рибосомы (показана в виде молекулярной поверхности), образующего участок связывания стрептомицина (показан сиреневой проволочной моделью и подписан). Зелеными Ван-дер-Ваальсовыми сферами показана метильная группа нуклеотидного остатка m^7G527 16S рРНК (подписана). Подписана спираль 18 16S рРНК. При создании рисунка, включая наложение пространственных структур друг на друга и моделирование модифицированных нуклеотидных остатков, использовалась программа UCSF Chimera [10]. В создании рисунка использовались вторичные структуры рРНК [11], а также пространственные структуры 1J5E [93], 3OTO [90], 4V4H [94], 4NXM [95]

инактивация гена метилтрансферазы «домашнего хозяйства» RsmG, модифицирующей G527 16S рРНК по N7 положению (рис. 4, *а* и *г*; таблица), обеспечивает небольшой уровень устойчивости к данному антибиотику у штамма *Streptomyces coelicolor* [96]. В ходе дальнейших исследований было показано, что удаление гена *gidB* (гомолога *rsmG*, также модифицирующего G527) у патогенных бактерий *M. tuberculosis* и *Salmonella enterica* также обеспечивает небольшую устойчивость к стрептомицину [97, 98]. Структура рибосомы в комплексе со стрептомицином (рис. 4, *д*) показывает, что нуклеотидный остаток G527 находится в непосредственной близости от места связывания антибиотика [99], но метильная группа не перекрывается напря-

мую с положением антибиотика. Предположение о том, что метилирование нуклеотидного остатка G527 16S рРНК приводит к конформационным изменениям не было подтверждено экспериментально [95]. Несмотря на отсутствие значительного влияния делеции гена *rsmG* на рост бактерий [34], на примере *Salmonella* было показано, что такие мутанты проигрывают конкуренцию штаммам дикого типа [98]. Хотя инактивация гена *rsmG* дает весьма небольшой уровень устойчивости к стрептомицину, по сравнению с мутациями в гене рибосомного белка S12, повреждение гена *rsmG* оказывается важной предпосылкой для дальнейшего появления этих мутаций. На примере *Bacillus subtilis* было показано, что делеция *rsmG* повышает точность трансляции, и при этом в таких штаммах значительно (в 200 раз) возрастает частота мутации устойчивости к стрептомицину в гене *rpsL*, кодирующем белок S12 [96]. Аналогичный результат был получен и для *E. coli*. На фоне делеции *rsmG*, обеспечивающей умеренную устойчивость к стрептомицину, повышается частота мутаций в *rpsL* (S12), еще сильнее увеличивающих устойчивость [100].

Активность $RlmA^{II}$ у *Bacillus subtilis*, как уже обсуждалось ранее, обеспечивает устойчивость к тилозину. В случае *E. coli* делеция гена его паралога *rlmA*^{I}, отвечающего за образование m^1G745 23S рРНК, приводит к устойчивости к виомицину [101], несмотря на отсутствие контактов между виомицином и этим модифицированным нуклеотидным остатком. Согласно результатам экспериментов по футпринтингу, при делеции гена *rlmA*^{I} скорее всего не происходит связывание антибиотика. Как и в случае других делеций генов метилтрансфераз «домашнего хозяйства», инактивация *rlmA*^{I} имеет негативные последствия для приспособленности: снижается скорость роста, способность рибосомных субчастиц к ассоциации, а также эффективность трансляции [101]. Возможно, структурные изменения, снижающие эффективность взаимодействия субчастиц, также обусловливают устойчивость к виомицину, так как сайт связывания этого антибиотика расположен в непосредственной близости от межсубчастичного мостика B2a.

В сайте связывания тигециклина расположен нуклеотидный остаток m^2G966 [102], модифицированный метилтрансферазой RsmD [83]. На примере *S. pneumoniae* было показано, что инактивация этой метилтрансферазы «домашнего хозяйства» приводит к небольшому повышению уровня устойчивости к тигециклину [103] (таблица). И наоборот, при делеции *rsmD* в клетках *E. coli* чувствительность к тетрациклину возрастает [104]. При некоторой противоречивости данных наблюдений это один из немногих примеров, когда метилтрансфераза «домашнего хозяйства» обеспечивает некоторый уровень устойчивости к антибиотикам. Мы также видим, что нередко для чувствительности к антибиотикам нужны модифицированные ферментами «домашнего хозяйства» нуклеотидные остатки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотики – один из инструментов, используемый живыми организмами в конкурентной борьбе за ресурсы и территорию, при этом механизмы устойчивости обеспечивают возможность продуцирования антибиотиков или выживания в их присутствии. Большинство известных ингибиторов синтеза белка связываются в функциональных центрах рибосомы. Эти центры также обогащены модифицированными, в основном метилированными, нуклеотидными остатками [2]. Как видно, метилирование рРНК является одним из основных механизмов устойчивости к антибиотикам, причем высокий уровень устойчивости даёт присоединение метильных групп так, что их положение начинает перекрываться с участком связывания антибиотика. Однако это не единственный механизм устойчивости, вызванной метилированием. На примере EfmM видно, что метилирование может, предположительно, вытеснять молекулу воды, опосредующую дополнительный контакт антибиотика и рРНК.

Необычной, на первый взгляд, кажется ситуация, когда метилирование рРНК способствует связыванию антибиотика. Тем не менее это не редкость. В некоторых случаях можно предположить, что антибиотик напрямую контактирует с метильной группой, формируя гидрофобные или Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Такой механизм можно предположить для взаимодействия капреомицина с Cm1409 16S рРНК или телитромицина с m^1G748. При отсутствии прямого контакта метильной группы рРНК с антибиотиком влияние на активность последнего может быть опосредовано конформационным изменением рРНК, зависящим от метилирования. Подобное явление хорошо документировано для влияния $m_2^6A1518/19$ 16S рРНК на активность касугамицина. Подозревать подобный механизм можно в случае m^2A2503 23S рРНК и линезолида, спарсомицина и тиамулина, m^3U1498 16S рРНК и аминогликозидов, m^1G745 23S рРНК и виомицина. Сложнее объяснить, как метильная группа рРНК может способствовать связыванию антибиотика, если не удается наблюдать ни контакт между ними, ни

изменение конформации, как например, в случае m^7G527 16S рРНК и стрептомицина. Тогда можно подозревать либо то, что взаимодействие или изменение конформации реализуется в каком-то другом функциональном, возможно, промежуточном состоянии транслирующей рибосомы, либо что метилирование влияет на связывание антибиотика опосредованно, например, через вытеснение молекулы воды.

Интересны эволюционные взаимоотношения метилтрансфераз, вызывающих устойчивость к антибиотикам, и метилтрансфераз «домашнего хозяйства». Согласно общепринятому взгляду, последние распространяются «вертикально», т.е. эволюционируют вместе с соответствующими таксонами. Метилтрансферазы, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, характерны либо для узкой группы соответствующих видов-продуцентов, либо распространяются путем «горизонтального переноса генов», при том что исходно также происходят от соответствующих ферментов бактерий-продуцентов. Если же задаваться вопросом, откуда появились метилтрансферазы устойчивости у бактерий, производящих антибиотики, и, возможно, у некоторых других, можно представить себе сценарий, в котором ферменты «домашнего хозяйства» служат резервуаром для эволюции антибиотикорезистентности. Наиболее вероятен такой ход событий для появления метилтрансфераз семейства Erm из белков RsmA(KsgA). Возможно ли обратное, т.е. превращение метилтрансферазы устойчивости в метилтрансферазу «домашнего хозяйства»? Антибиотики и механизмы устойчивости к ним эволюционируют давно, и биосинтез антибиотиков, теоретически, может совершенствоваться таким образом, чтобы избежать устойчивости. Возможно, что повсеместное распространение генов устойчивости может превратить последние в вариант метилтрансфераз «домашнего хозяйства». Это возможно при условии, что метилирование не будет иметь негативных последствий, а возможно окажется полезным для приспособленности бактерий в отсутствие антибиотиков. «Цена» метилирования, вызывающего устойчивость к антибиотикам, может варьировать от значительной потери приспособленности, например при метилировании A2058 23S рРНК ферментами Erm семейства, до практически нулевой, например при метилировании A1408 белком NpmA. Удивителен пример снижения «цены» устойчивости к амикацину, вызванной мутацией A1408G 16S рРНК при помощи метилтрансферазы TlyA, модифицирующей соседний нуклеотидный остаток.

В научной литературе можно найти очень мало примеров, не противоречащих возможному эволюционному происхождению ферментов «домашнего хозяйства» от метилтрансфераз антибиотикорезистентности. Модифицирующие ферменты RsmD и RluC, принадлежащие к когорте ферментов «домашнего хозяйства», приводят к некоторому уровню устойчивости к тетрациклину и тиамулину, клиндамицину и линезолиду соответственно. Метилтрансфераза $RlmA^{II}$, необходимая для образования m^1G748 23S рРНК и весьма широко распространенная среди грамположительных бактерий, обеспечивает некоторый уровень устойчивости к тилозину. Остается открытым вопрос: могут ли эти белки происходить от ферментов устойчивости к предковым антибиотикам, связывавшимся примерно в тех же участках, что и вышеперечисленные современные?

Хотя в прошлом исследование рРНК метилтрансфераз во многом ограничивалось модельными организмами и патогенами, а в поиске продуцентов антибиотиков преобладал сугубо утилитарный подход, диктуемый медицинской значимостью, будущее, на взгляд авторов данного обзора, принадлежит комплексным исследованиям совместной эволюции как системы модификации рибосом, так и биосинтеза антибактериальных соединений.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 20-04-00736 и 20-54-53014).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arenz, S., and Wilson, D. N. (2016) Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a025361, doi: 10.1101/cshperspect.a025361.
2. Sergiev, P. V., Aleksashin, N. A., Chugunova, A. A., Polikanov, Y. S., and Dontsova, O. A. (2018) Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 226-235.
3. Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., and Korshunova, G. A. (2010) Ribosomal tunnel and translation regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1501-1516.

4. Skinner, R., Cundliffe, E., and Schmidt, F. J. (1983) Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics, *J. Biol. Chem.*, **258**, 12702-12706.
5. Pernodet, J. L., Fish, S., Blondelet-Rouault, M. H., and Cundliffe, E. (1996) The macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes characterized by using a specifically deleted, antibiotic-sensitive strain of Streptomyces lividans, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 581-585.
6. Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J., and Seppala, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2823-2830.
7. Arthur, M., Brisson-Noël, A., and Courvalin, P. (1987) Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses, *J. Antimicrob. Chemother.*, **20**, 783-802.
8. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
9. Bhujbalrao, R., and Anand, R. (2019) Deciphering determinants in ribosomal methyltransferases that confer antimicrobial resistance, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 1425-1429.
10. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612.
11. The RNAcentral Consortium (2019) RNAcentral: a hub of information for non-coding RNA sequences, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D221-D229.
12. Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117-128.
13. Bulkley, D., Innis, C. A., Blaha, G., and Steitz, T. A. (2010) Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 17158-17163.
14. Svetlov, M. S., Plessa, E., Chen, C.-W., Bougas, A., Krokidis, M. G., Dinos, G. P., and Polikanov, Y. S. (2019) High-resolution crystal structures of ribosome-bound chloramphenicol and erythromycin provide the ultimate basis for their competition, *RNA*, **25**, 600-606.
15. Gupta, P., Sothiselvam, S., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2013) Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible, *Nat. Commun.*, **4**, 1984.
16. Subramanian, S. L., Ramu, H., and Mankin, A. S. (2012) Inducible resistance to macrolide antibiotics, in *Antibiotic Discovery and Development* (Dougherty, T. J., and Pucci, M. J., eds), Springer US, Boston, MA, pp. 455-484.
17. Vazquez-Laslop, N., Thum, C., and Mankin, A. S. (2008) Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling, *Mol. Cell*, **30**, 190-202.
18. Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., and Wilson, D. N. (2014) Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide, *Nat. Commun.*, **5**, 3501.
19. Weisblum, B. (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 797-805.
20. Kwak, J. H., Choi, E. C., and Weisblum, B. (1991) Transcriptional attenuation control of ermK, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*, *J. Bacteriol.*, **173**, 4725-4735.
21. Morris, R. P., Nguyen, L., Gatfield, J., Visconti, K., Nguyen, K., Schnappinger, D., Ehrt, S., Liu, Y., Heifets, L., Pieters, J., Schoolnik, G., and Thompson, C. J. (2005) Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 12200-12205.
22. Gupta, P., Kannan, K., Mankin, A. S., and Vázquez-Laslop, N. (2013) Regulation of gene expression by macrolide-induced ribosomal frameshifting, *Mol. Cell*, **52**, 629-642.
23. Liu, M., and Douthwaite, S. (2002) Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 14658-14663.
24. Liu, M., and Douthwaite, S. (2002) Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria, *Mol. Microbiol.*, **44**, 195-204.
25. Yakhnin, H., Yakhnin, A. V., Mouery, B. L., Mandell, Z. F., Karbasiafshar, C., Kashlev, M., and Babitzke, P. (2019) NusG-dependent RNA polymerase pausing and tylosin-Dependent ribosome stalling are required for tylosin resistance by inducing 23S rRNA methylation in *Bacillus subtilis*, *mBio*, **10**, e02665-19.
26. Takaya, A., Sato, Y., Shoji, T., and Yamamoto, T. (2013) Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by $RlmA^{II}$ methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin susceptible, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 3789-3796.
27. Desmolaize, B., Fabret, C., Brégeon, D., Rose, S., Grosjean, H., and Douthwaite, S. (2011) A single methyltransferase YefA (RlmCD) catalyses both m5U747 and m5U1939 modifications in Bacillus subtilis 23S rRNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9368-9375.
28. Shoji, T., Takaya, A., Sato, Y., Kimura, S., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2015) RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by methyltransferase $RlmA^{II}$ in 23S rRNA in *Streptococcus pneumoniae*; interplay between two rRNA methylations responsible for telithromycin susceptibility, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8964-8972.
29. Long, K. S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., and Vester, B. (2006) The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2500-2505.
30. LaMarre, J. M., Locke, J. B., Shaw, K. J., and Mankin, A. S. (2011) Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cfr*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 3714-3719.
31. Smith, L. K., and Mankin, A. S. (2008) Transcriptional and translational control of the mlr operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1703-1712.
32. Toh, S.-M., Xiong, L., Bae, T., and Mankin, A. S. (2008) The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA, *RNA*, **14**, 98-106.
33. LaMarre, J. M., Howden, B. P., and Mankin, A. S. (2011) Inactivation of the indigenous methyltransferase RlmN in *Staphylococcus aureus* increases linezolid resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 2989-2991.
34. Pletnev, P., Guseva, E., Zanina, A., Evfratov, S., Dzama, M., et al. (2020) Comprehensive functional analysis of *Escherichia coli* ribosomal RNA methyltransferases, *Front. Genet.*, **11**, 97.
35. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., and Mankin, A. S. (2010) The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide, *EMBO J.*, **29**, 3108-3117.
36. Kaminska, K. H., Purta, E., Hansen, L. H., Bujnicki, J. M., Vester, B., and Long, K. S. (2010) Insights into the structure, function and evolution of the radical-SAM 23S rRNA

methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1652-1663.
37. Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., Hansen, L. H., Gondela, A., Long, K., Vester, B., and Kirpekar, F. (2009) Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria, *RNA*, **15**, 327-336.
38. Yan, F., LaMarre, J. M., Röhrich, R., Wiesner, J., Jomaa, H., Mankin, A. S., and Fujimori, D. G. (2010) RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3953-3964.
39. Atkinson, G. C., Hansen, L. H., Tenson, T., Rasmussen, A., Kirpekar, F., and Vester, B. (2013) Distinction between the Cfr methyltransferase conferring antibiotic resistance and the housekeeping RlmN methyltransferase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 4019-4026.
40. Stojković, V., Noda-Garcia, L., Tawfik, D. S., and Fujimori, D. G. (2016) Antibiotic resistance evolved via inactivation of a ribosomal RNA methylating enzyme, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 8897-8907.
41. Benítez-Páez, A., Villarroya, M., and Armengod, M.-E. (2012) The *Escherichia coli* RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy, *RNA*, **18**, 1783-1795.
42. Conrad, J., Sun, D., Englund, N., and Ofengand, J. (1998) The rluC gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23 S ribosomal RNA, *J. Biol. Chem.*, **273**, 18562-18566.
43. Toh, S.-M., and Mankin, A. S. (2008) An indigenous post-transcriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors, *J. Mol. Biol.*, **380**, 593-597.
44. Davies, J., Gorini, L., and Davis, B. D. (1965) Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics, *Mol. Pharmacol.*, **1**, 93-106.
45. Hausner, T. P., Geigenmüller, U., and Nierhaus, K. H. (1988) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13103-13111.
46. Doi, Y., and Arakawa, Y. (2007) 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides, *Clin. Infect. Dis.*, **45**, 88-94.
47. Grosjean, H. (2009) *DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution*, Landes Bioscience, Austin, Tex.
48. Doi, Y., Wachino, J., and Arakawa, Y. (2016) Aminoglycoside Resistance, *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **30**, 523-537.
49. Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., et al. (2007) Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 4401-4409.
50. Macmaster, R., Zelinskaya, N., Savic, M., Rankin, C. R., and Conn, G. L. (2010) Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7791-7799.
51. Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., et al. (2007) Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 727-732.
52. Stanley, R. E., Blaha, G., Grodzicki, R. L., Strickler, M. D., and Steitz, T. A. (2010) The structures of the anti-tuberculosis antibiotics viomycin and capreomycin bound to the 70S ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 289-293.
53. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., and Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA, *Science*, **313**, 19351942.
54. Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y., and Courvalin, P. (2011) Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM, *RNA*, **17**, 251-262.
55. Demirci, H., Larsen, L. H. G., Hansen, T., Rasmussen, A., Cadambi, A., Gregory, S. T., Kirpekar, F., and Jogl, G. (2010) Multi-site-specific 16S rRNA methyltransferase RsmF from *Thermus thermophilus*, *RNA*, **16**, 1584-1596.
56. François, B., Russell, R. J. M., Murray, J. B., Aboul-ela, F., Masquida, B., Vicens, Q., and Westhof, E. (2005) Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5677-5690.
57. Maus, C. E., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. (2005) Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 571-577.
58. Sałamaszyńska-Guz, A., Rose, S., Lykkebo, C. A., Taciak, B., Bącal, P., Uśpieński, T., and Douthwaite, S. (2017) Biofilm formation and motility are promoted by Cj0588-directed methylation of rRNA in *Campylobacter jejuni*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 533.
59. Johansen, S. K., Maus, C. E., Plikaytis, B. B., and Douthwaite, S. (2006) Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs, *Mol. Cell*, **23**, 173-182.
60. Ermolenko, D. N., Spiegel, P. C., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007) The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 493-497.
61. Monshupanee, T., Johansen, S. K., Dahlberg, A. E., and Douthwaite, S. (2012) Capreomycin susceptibility is increased by TlyA-directed 2'-O-methylation on both ribosomal subunits, *Mol. Microbiol.*, **85**, 1194-1203.
62. Rahman, A., Srivastava, S. S., Sneh, A., Ahmed, N., and Krishnasastry, M. V. (2010) Molecular characterization of *tlyA* gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: a non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase, *BMC Biochem.*, **11**, 35.
63. Freihofer, P., Akbergenov, R., Teo, Y., Juskeviciene, R., Andersson, D. I., and Böttger, E. C. (2016) Nonmutational compensation of the fitness cost of antibiotic resistance in mycobacteria by overexpression of *tlyA* rRNA methylase, *RNA*, **22**, 1836-1843.
64. Felnagle, E. A., Rondon, M. R., Berti, A. D., Crosby, H. A., and Thomas, M. G. (2007) Identification of the biosynthetic gene cluster and an additional gene for resistance to the antituberculosis drug capreomycin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4162-4170.
65. Bijpuria, S., Sharma, R., and Taneja, B. (2020) Deletion of RsmE 16S rRNA methyltransferase leads to low level increase in aminoglycoside resistance in *Mycobacterium smegmatis*, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.01.15.907279.
66. Basturea, G. N., Rudd, K. E., and Deutscher, M. P. (2006) Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family, *RNA*, **12**, 426-434.
67. Andersen, N. M., and Douthwaite, S. (2006) YebU is a m5C methyltransferase specific for 16 S rRNA nucleotide 1407, *J. Mol. Biol.*, **359**, 777-786.

68. Gutierrez, B., Escudero, J. A., San Millan, A., Hidalgo, L., Carrilero, L., Ovejero, C. M., Santos-Lopez, A., Thomas-Lopez, D., and Gonzalez-Zorn, B. (2012) Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 2335-2341.
69. Lioy, V. S., Goussard, S., Guerineau, V., Yoon, E.-J., Courvalin, P., Galimand, M., and Grillot-Courvalin, C. (2014) Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host, *RNA*, **20**, 382-391.
70. Kimura, S., and Suzuki, T. (2010) Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1341-1352.
71. Vidučić, D., Obranić, S., Matovina, M., Babić, F., and Vlahoviček, G. M. (2014) Host fitness effects of aminoglycoside resistance 16S rRNA G1405 and A1408 methyltransferases from clinical pathogens and natural antibiotic producers, *FEBS J.*, 281, Suppl. s1, 285.
72. Thompson, J., Schmidt, F., and Cundliffe, E. (1982) Site of action of a ribosomal RNA methylase conferring resistance to thiostrepton, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7915-7917.
73. Lentzen, G., Klinck, R., Matassova, N., Aboul-ela, F., and Murchie, A. I. H. (2003) Structural basis for contrasting activities of ribosome binding thiazole antibiotics, *Chem. Biol.*, **10**, 769-778.
74. Harms, J. M., Wilson, D. N., Schluenzen, F., Connell, S. R., Stachelhaus, T., Zaborowska, Z., Spahn, C. M. T., and Fucini, P. (2008) Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococcin, *Mol. Cell*, **30**, 26-38.
75. Cundliffe, E., and Thompson, J. (1981) The mode of action of nosiheptide (multhiomycin) and the mechanism of resistance in the producing organism, *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 185-192.
76. Arenz, S., Juette, M. F., Graf, M., Nguyen, F., Huter, P., Polikanov, Y. S., Blanchard, S. C., and Wilson, D.N. (2016) Structures of the orthosomycin antibiotics avilamycin and evernimicin in complex with the bacterial 70S ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7527-7532.
77. Weitnauer, G., Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Westrich, L., Quiros, L. M., Mendez, C., Salas, J. A., and Bechthold, A. (2001) An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* Tь57, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 690-695.
78. Treede, I., Jakobsen, L., Kirpekar, F., Vester, B., Weitnauer, G., Bechthold, A., and Douthwaite, S. (2003) The avilamycin resistance determinants AviRa and AviRb methylate 23S rRNA at the guanosine 2535 base and the uridine 2479 ribose, *Mol. Microbiol.*, **49**, 309-318.
79. Mann, P. A., Xiong, L., Mankin, A. S., Chau, A. S., Mendrick, C. A., et al. (2001) EmtA, a rRNA methyltransferase conferring high-level evernimicin resistance, *Mol. Microbiol.*, **41**, 1349-1356.
80. Ballesta, J. P., and Cundliffe, E. (1991) Site-specific methylation of 16S rRNA caused by pct, a pactamycin resistance determinant from the producing organism, *Streptomyces pactum*, *J. Bacteriol.*, **173**, 7213-7218.
81. Mankin, A. S. (1997) Pactamycin resistance mutations in functional sites of 16 S rRNA, *J. Mol. Biol.*, **274**, 8-15.
82. Polikanov, Y. S., Osterman, I. A., Szal, T., Tashlitsky, V. N., Serebryakova, M. V., et al. (2014) Amicoumacin a inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome, *Mol. Cell*, **56**, 531-540.
83. Lesnyak, D. V., Osipiuk, J., Skarina, T., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., et al. (2007) Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16 S rRNA: functional identification and tertiary structure, *J. Biol. Chem.*, **282**, 5880-5887.
84. Gu, X. R., Gustafsson, C., Ku, J., Yu, M., and Santi, D. V. (1999) Identification of the 16S rRNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **38**, 4053-4057.
85. Tscherne, J. S., Nurse, K., Popienick, P., Michel, H., Sochacki, M., and Ofengand, J. (1999) Purification, cloning, and characterization of the 16S RNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **38**, 1884-1892.
86. Prokhorova, I. V., Osterman, I. A., Burakovsky, D. E., Serebryakova, M. V., Galyamina, M. A., et al. (2013) Modified nucleotides m(2)G966/m(5)C967 of *Escherichia coli* 16S rRNA are required for attenuation of tryptophan operon, *Sci. Rep.*, **3**, 3236.
87. Helser, T. L., Davies, J. E., and Dahlberg, J. E. (1972) Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*, *Nature New Biol.*, **235**, 6-9.
88. Schluenzen, F., Takemoto, C., Wilson, D. N., Kaminishi, T., Harms, J. M., et al. (2006) The antibiotic kasugamycin mimics mRNA nucleotides to destabilize tRNA binding and inhibit canonical translation initiation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 871-878.
89. Vila-Sanjurjo, A., Squires, C. L., and Dahlberg, A. E. (1999) Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16 S ribosomal RNA of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **293**, 1-8.
90. Demirci, H., Murphy, F., Belardinelli, R., Kelley, A. C., Ramakrishnan, V., Gregory, S. T., Dahlberg, A. E., and Jogl, G. (2010) Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function, *RNA*, **16**, 2319-2324.
91. Connolly, K., Rife, J. P., and Culver, G. (2008) Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA, *Mol. Microbiol.*, **70**, 1062-1075.
92. Mecsas, J., Bilis, I., and Falkow, S. (2001) Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis, *Infect. Immun.*, **69**, 2779-2787.
93. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit, *Nature*, **407**, 327-339.
94. Schuwirth, B. S., Day, J. M., Hau, C. W., Janssen, G. R., Dahlberg, A. E., Cate, J. H. D., and Vila-Sanjurjo, A. (2006) Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation, *Nat. Struct. Mol. Biol*, **13**, 879-886.
95. Demirci, H., Murphy, F. V., Murphy, E. L., Connetti, J. L., Dahlberg, A. E., Jogl, G., and Gregory, S. T. (2014) Structural analysis of base substitutions in *Thermus thermophilus* 16S rRNA conferring streptomycin resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 4308-4317.
96. Nishimura, K., Hosaka, T., Tokuyama, S., Okamoto, S., and Ochi, K. (2007) Mutations in rsmG, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.*, **189**, 3876-3883.
97. Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., and Ochi, K. (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria, *Mol. Microbiol.*, **63**, 1096-1106.
98. Mikheil, D. M., Shippy, D. C., Eakley, N. M., Okwumabua, O. E., and Fadl, A. A. (2012) Deletion of gene encoding methyltransferase (gidB) confers high-level antimicrobial resistance in *Salmonella*, *J. Antibiot,*, **65**, 185-192.

99. Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature*, **407**, 340-348.
100. Benítez-Páez, A., Cárdenas-Brito, S., Corredor, M., Villarroya, M., and Armengod, M. E. (2013) Mutaciones en genes modificadores de ARN ribosómico y la resistencia a aminoglucósidos: el caso del gen *rsmG*, *Biomédica*, **34**, 41, doi: 10.7705/biomedica.v34i0.1702.
101. Gustafsson, C., and Persson, B. C. (1998) Identification of the rrmA gene encoding the 23S rRNA m^1G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m^1G745-deficient mutant, *J. Bacteriol.*, **180**, 359-365.
102. Jenner, L., Starosta, A. L., Terry, D. S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Wilson, D. N., and Yusupova, G. (2013) Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.A*, **110**, 3812-3816.
103. Lupien, A., Gingras, H., Leprohon, P., and Ouellette, M. (2015) Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA, *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2973-2980.
104. Nichols, R. J., Sen, S., Choo, Y. J., Beltrao, P., Zietek, M., et al. (2011) Phenotypic landscape of a bacterial cell, *Cell*, **144**, 143-156.

rRNA METHYLATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

Review

I. A. Osterman[1,2], O. A. Dontsova[1,2,3], and P. V. Sergiev[1,2,4]*

[1] *Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, 143028 Skolkovo, Russia; E-mail: petya@genebee.msu.ru*

[2] *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

[3] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

[4] *Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received June 12, 2020
Revised July 16, 2020
Accepted July 16, 2020

Methylation of nucleotides in rRNA is one of the basic mechanisms of bacterial resistance to protein synthesis inhibitors. The genes for corresponding methyltransferases have been found in producer strains and clinical isolates of pathogenic bacteria. In some cases, rRNA methylation by housekeeping enzymes is, on the contrary, required for the action of antibiotics. The effects of rRNA modifications associated with antibiotic efficacy may be cooperative or mutually exclusive. Evolutionary relationships between the systems of rRNA modification by housekeeping enzymes and antibiotic resistance-related methyltransferases are of particular interest. In this review, we discuss the above topics in detail.

Keywords: ribosome, methylation, antibiotics, macrolides, aminoglycosides

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1587 – 1600

УДК 579.61

БАКТЕРИОФАГИ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ: ЧТО СДЕРЖИВАЕТ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Обзор

© 2020 В.В. Власов*, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: vvlassov@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2020
После доработки 18.08.2020
Принята к публикации 18.08.2020

Все более широкое распространение бактериальных патогенов, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам, требует разработки новых подходов для борьбы с инфекциями. Одним из подходов, на который возлагаются большие надежды, является фаготерапия. В последние годы научные организации и ряд фармацевтических компаний активизировали исследования, направленные на создание терапевтических препаратов на основе бактериофагов. В США и европейских странах созданы центры, в которых фаготерапия в экспериментальном режиме применяется для лечения пациентов, не поддающихся терапии антибиотиками. В настоящем обзоре описаны особенности бактериофагов как средств терапии, критически обсуждаются результаты клинических испытаний препаратов бактериофагов и оцениваются перспективы применения фаготерапии для лечения отдельных видов инфекционных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, фаготерапия, бактериальные инфекции, множественная лекарственная устойчивость, синтетические бактериофаги.

DOI: 10.31857/S0320972520110068

ВВЕДЕНИЕ

Множественная антибиотикоустойчивость патогенных бактерий в настоящее время рассматривается как глобальная проблема. Смертность от инфекций, вызываемых такими бактериями, с каждым годом растет, и, по оценкам специалистов Всемирной организации здравоохранения, к 2050 г. может достичь 10 млн смертей в год и превысить смертность от онкологических заболеваний (https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report). К наиболее опасным относят обладающие множественной лекарственной устойчивостью бактерии из группы ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* species. В сложившейся ситуации ведется интенсивный поиск новых препаратов и подходов для борьбы с патогенными бактериями. В качестве одного из таких перспективных подходов в настоящее время рассматривается фаготерапия. Впервые терапия бактериофагами была применена столетие назад для лечения острых кишечных заболеваний и кожных инфекций [1, 2].

Наиболее активно и успешно использовали бактериофаги в СССР преимущественно для лечения раневых инфекций, включая послеоперационные осложнения [3–5], и кишечных заболеваний, в том числе и во время вспышек холеры [6–8].

После появления антибиотиков, с помощью которых в первые годы их применения удавалось успешно решить проблему бактериальных инфекций, интерес к фаготерапии угас, в том числе и в связи в недостаточной готовностью науки и технологий того времени для производства сложных биофармацевтических препаратов бактериофагов. В 1960–2000 гг. фаготерапия применялась лишь в нескольких центрах – в Польше и в Грузии, а единственной страной, где бактериофаги для медицинских целей производились промышленно, был СССР и впоследствии Российская Федерация. Терапевтические препараты бактериофагов применяли в виде монотерапии [9–11] или в комплексном лечении совместно с антибиотиками [10, 12, 13].

Все изменилось в последние годы. Современные методы позволяют детально характеризовать бактериофаги, вносить изменения в их геномы и даже конструировать синтетические бактериофаги, производить препараты индиви-

* Адресат для корреспонденции.

дуальных бактериофагов в условиях GMP. Интерес к фаготерапии в последние годы был подогрет рядом сообщений об успешном применении бактериофагов для лечения пациентов в критическом состоянии, зараженных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [14–17]. Второй год в США и в Европе проводятся крупные конгрессы по фаготерапии, тематика которых ориентирована на практическое применение бактериофагов (https://www.kisacoresearch.com/events/phage-futures-europe; https://phage-futures.com/events/phage-futures-2019). Появился ряд компаний, разрабатывающих препараты бактериофагов; во многих странах ведутся клинические испытания таких препаратов. Однако, по мнению авторов обзора, рассмотрение свойств бактериофагов, критический взгляд на результаты исследований бактериофагов в экспериментальных моделях инфекций и результаты клинических испытаний не дают поводов для эйфории и указывают на значительные трудности, которые исследователям предстоит преодолеть для создания действительно эффективных методов фаготерапии.

СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Вирусы бактерий – бактериофаги – являются одной из наиболее распространенных форм жизни на планете. Они присутствуют повсеместно, в воде и на суше, и, вероятно, для каждого бактериального штамма можно найти специфичный бактериофаг. Бактериофаги чрезвычайно эффективны как бактерицидные агенты и как потенциальные терапевтические препараты, они обладают рядом достоинств. Бактериофаги – это природные объекты, при их применении не возникает экологических проблем. Они не приносят вреда клеткам высших организмов, не токсичны, высокоспецифичны и, убивая целевые патогенные бактерии, не приносят вреда нормальной микрофлоре макроорганизма. Бактериофаги регулируют состав микробиоты, у здоровых людей в кишечнике насчитывают более 1000 разновидностей фагов. Наиболее распространенные фаги, обнаруживаемые в кишечнике, принадлежат к порядку Caudovirales (семейства Myoviridae, Siphoviridae и Podoviridae), к тому же порядку, представители которого используются в фаготерапии [18, 19].

Бактериофаги способны проникать через слои клеток эпителия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) по механизму трансцитоза – они могут перемещаться через слизистые оболочки в кровь и далее в органы дыхания, в выделительные органы или к месту размножения бактерий в организме. В мочевой пузырь бактериофаги могут попадать напрямую из кишечника. Полагают, что ежедневно в организме человека из кишечника трансцитозом попадает в другие ткани и органы около 10^9 фаговых частиц, формируя фаговое сообщество, влияющее на здоровье и иммунитет [20, 21]. Бактериофаги способны проникать через некоторые физиологические барьеры, например гематоэнцефалический барьер, а также попадать в пораженные остеомиелитом кости [22]. В присутствии целевых бактерий фаги размножаются в пораженных участках организма, например в инфицированной ране, а после уничтожения патогена фаги разрушаются тканевыми макрофагами, в процесс выведения бактериофагов вовлечены печень и почки [23].

Высокая специфичность бактериофагов является не только их достоинством, но и недостатком. Для надежного подавления инфекционного агента требуется целый набор фагов, специфичных ко всем штаммам инфекционного агента, или для успешного лечения пациента необходимо подбирать препарат фага, специфичный именно к тому штамму, который вызвал инфекцию. Более того, существует возможность возникновения устойчивости целевой бактерии к применяемому бактериофагу в процессе терапии, и в этом случае необходимо искать новый бактериофаг [13, 14]. В этом заключается одна из проблем фаготерапии, приводящая к тому, что бактериофаги не могут рассматриваться как препараты первой линии терапии. Лечение бактериальной инфекции в большинстве случаев может быть успешно проведено применением одного-двух антибиотиков, которые дешевы в производстве, хорошо хранятся и обладают широкой специфичностью. Бактериофаги становятся необходимыми лишь в случае неудачи антибиотикотерапии, и рынок для них меньше. Важно, что бактериофаги можно применять совместно с антибиотиками [24, 25].

У бактерий существует множество механизмов защиты от бактериофагов, блокирующих каждый из этапов инфицирования клеток. К наиболее известным механизмам защиты относятся: изменение рецептора – поверхностного белка бактерии, узнаваемого фаговой частицей, что препятствует адсорбции фага на бактерии; изменение белков, функции которых необходимы для проникновения нуклеиновой кислоты бактериофага в клетку; системы рестрикции-модификации, защищающие от ферментов рестрикции бактериальную ДНК и позволяющие этим

ферментам избирательно расщеплять фаговую ДНК; а также системы типа CRISPR-Cas, обеспечивающие распознавание и избирательное разрушение ранее встречавшихся бактериям фаговых нуклеиновых кислот [26]. Бактерии могут защищаться от бактериофагов также, как и от антибиотиков и от клеток иммунной системы – формируя физический барьер, биоплёнки. Некоторые бактериофаги обладают способностью разрушать биопленки с помощью специальных ферментов и лизировать содержащиеся в них бактерии [27, 28]. Одним из способов борьбы с устойчивостью бактерий является использование коктейлей бактериофагов [29–31]. Если фаги убивают бактерии быстрее, чем они реплицируются, риск возникновения устойчивости снижается.

Введение бактериофагов в организм вызывает иммунный ответ, сила которого определяется природой фага, методом его введения и особенностями организма [32, 33]. Показано, что дендритные клетки реагируют на бактериофаги как на инфекционные агенты, и при контакте с ними происходит стимуляция врожденного и адаптивного иммунного ответа [34–36]. Высказывались предположения, что иммунный ответ организма может снижать эффективность повторного применения одного и того же препарата бактериофага у пациента. Бактериофаги являются частью микробиоты здоровых людей, присутствуют в организме в больших количествах, и их взаимодействие с иммунной системой оказывается весьма сложным и на данный момент недостаточно исследованным [37, 38]. Эксперименты показали, что для достижения клинически значимого иммунного ответа необходимо введение значительного количества бактериофагов, гораздо большего, чем количество необходимое для фаготерапии. В ряде исследований не было найдено связи между продукцией нейтрализующих антител против бактериофагов и клиническим результатом терапии [32, 39–41]. Однако в других исследованиях такая зависимость была обнаружена [39, 42]. Вероятно, лизис бактерий фагами происходит до того, как иммунная система начинает продуцировать антитела против бактериофагов. Сообщалось, что введение фагов может благотворно влиять на функции иммунной системы: введение бактериофагов снижает уровень провоспалительных цитокинов и инфильтрацию лейкоцитов в ткани [36, 38, 43]. Вместе с тем имеются и противоположные наблюдения [44, 45].

Исследования показали, что в ряде случаев при совместном использовании антибиотиков и бактериофагов наблюдался синергический эффект [46]. Возникающая устойчивость к бактериофагу, обусловленная изменениями структуры бактериального рецептора или других белков, может негативно сказаться на жизнеспособности бактерии, так как приводит к повышению ее чувствительности к антибиотикам [47].

ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГОВ

Бактериофаги выделяют из самых различных источников окружающей среды. В настоящее время в исследовательских организациях разных стран имеется большое количество бактериофагов, многие из которых исследованы с помощью современных молекулярно-биологических методов: расшифрованы их геномы, исследованы их специфичность и противобактериальные свойства. В ряде стран имеются банки бактериофагов, например Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses at the University of Laval, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures и Bacteriophage Bank of Korea, которые распространяют бактериофаги на коммерческой основе. Компании, разрабатывающие продукты для фаготерапии, имеют собственные коллекции, доступ к которым ограничен.

Практика показала, что для выбора бактериофага, требующегося для лечения конкретного больного, может быть необходим широкий поиск в разных коллекциях. Например, в известном случае успешного излечения пациента, зараженного *A. baumannii* с множественной устойчивостью к антибиотикам, потребовалось девять различных бактериофагов, которые нашли в трех разных коллекциях [14].

Для экстренного поиска нужного бактериофага при лечении конкретного пациента создан координирующий орган – «Каталог» организаций более чем из 20 стран, занимающихся фаготерапией (https://phage.directory), позволяющий быстро находить контакты для обмена фагами, требующимися для лечения больных.

При создании препаратов бактериофагов для терапии используется два подхода. Первый из них предусматривает формирование коктейля бактериофагов, действующих на разные штаммы определенного патогена или даже на несколько патогенов, которые участвуют в развитии инфекции определенного типа. В Грузии компанией «Biochimfarm Georgi» (Биохимфарм АО) производятся и обновляются дважды в год препараты «Пиофаг», содержащий бактериофаги против *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* и *Proteus*, а также «Интестифаг», включающий бактериофаги против бактерий, наиболее значимых в этиологии кишеч-

ных заболеваний. Эти коктейли используют для лечения инфекционных и кишечных заболеваний. В Российской Федерации НПО «Микроген» (http://www.bacteriofag.ru) производит более десяти различных комплексных препаратов бактериофагов для лечения бактериальных инфекций у людей. Компания НПЦ «Микромир» производит несколько ветеринарных препаратов бактериофагов, а также бактериофаг-содержащие гели, предназначенные для нормализации микробного состава кожи и полости рта (на данный момент гели производства НПЦ «Микромир» не являются лекарственными средствами).

Второй вариант фаготерапии предусматривает персонализированный подход, то есть подбор бактериофага или формирование фагового коктейля против конкретного патогена/патогенов, обнаруженных у пациента. Такой подход давно используется в Польше, «Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy», и в Грузии, «Центре фаготерапии» (http://medigroup.ge), где для пациентов подбирают бактериофаги в имеющейся коллекции и даже проводят поиск новых фагов, если в коллекции нужного фага не обнаруживается.

В настоящее время для фаготерапии используют только литические фаги [48, 49], не способные встраивать свой геном в геном бактерий, для того чтобы избежать возможность горизонтального переноса нежелательных генов. Бактериофаг должен быть проверен на отсутствие нежелательных генов, определяющих токсичность и антибиотикоустойчивость, а также генетических элементов, отвечающих за перенос фаговых генов в бактериальный геном, что возможно сделать методами пиросеквенирования [50, 51].

Существуют очевидные современные требования к препаратам бактериофагов для применения в медицине: производство должно осуществляться в условиях GMP; сам препарат должен быть стерильным и не содержать компоненты бактериальных клеток, например пирогенные субстанции, способные вызвать нежелательные эффекты.

В настоящее время не вполне решен вопрос создания лекарственных форм бактериофагов, обеспечивающих их стабильность при хранении и при разных способах введения в организм. Некоторые фаги хорошо хранятся в растворе, другие – в сухих препаратах, получаемых лиофилизацией в присутствии стабилизирующих агентов, таких как сахара (трегалоза, сорбитол) или молочный белок [52, 53]. Для стабилизации фаговые частицы можно заключать в липосомы [54–57], для защиты фагов от действия иммунной системы предлагалось модифицировать их поверхность полиэтиленгликолем [58].

Современные методы синтетической биологии позволяют комбинировать геномы бактериофагов и даже синтезировать полные искусственные геномы [59–61]. Это открывает принципиальную возможность получать бактериофаги с модифицированной специфичностью, а также бактериофаги, несущие гены, кодирующие продукты, токсичные для бактериальной клетки и воздействующие на определенные бактериальные гены [60]. Описано получение химерных бактериофагов, обладающих повышенной литической активностью и поражающих расширенный спектр бактерий-хозяев [62, 63]. Получены бактериофаги, содержащие гены, кодирующие ферменты, разрушающие бактериальные биопленки [64]. В геном фага вводили элементы, обеспечивающие продукцию в бактериальной клетке системы геномного редактирования CRISPR-Cas, что позволяло избирательно повредить бактериальные гены, ответственные за лекарственную устойчивость. С помощью такого фага удалось вызвать гибель бактерий, обладающих лекарственной устойчивостью, но не оказать повреждающего действия на клетки того же микроорганизма, не содержащего целевые генетические элементы [65, 66].

СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ В ОРГАНИЗМ

Бактериофаги могут быть введены в организм различными методами – пероральным, ингаляционным, местным и инъекционным (внутривенно, внутримышечно и подкожно в место поражения). При пероральном применении фаги подвергаются воздействию кислой среды в желудке, и для снижения повреждающего действия этого фактора необходимо предварительно нейтрализовать кислую среду или поместить препарат бактериофага в соответствующие капсулы. При пероральном введении бактериофаги, хотя и не всегда, могут обнаруживаться в кровотоке [23, 41, 67]. Для ингаляционной доставки фагов обычно используют небулайзеры [25, 68–70]. Местное применение фагов, входящих в состав кремов, мазей, эмульсий и гидрогелей, используют для лечения ожогов, гнойных ран при диабетической стопе, акне и других бактериальных поражениях кожи. Самый простой способ – орошение раны и/или прикладываемой салфетки раствором препарата бактериофага. При внутривенном введении фаги попадают практически во все органы и ткани. В этом случае выведение фагов из кровотока происходит в течение 60 минут.

Возможно также использование бактериофагов в качестве антибактериального покрытия имплантов для предотвращения инфекций, возникающих при имплантировании протезов в ортопедии [71–73].

ИСПЫТАНИЯ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ В ОПЫТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Возможности фаготерапии широкого спектра инфекционных заболеваний изучали на различных животных моделях [55, 74–77]. К сожалению, почти все эти модели не соответствовали реальным моделям заболеваний человека. Бактериемия у человека зачастую развивается как вторичное поражение, возникающее на фоне ранений, вирусных поражений или ослабления иммунной системы. При развитии инфекции бактерии выходят из начального очага поражения и образуют метастатические поражения в различных местах организма. Терапия начинается, как правило, при уже развившемся инфекционном процессе. Почти во всех описанных экспериментах здоровых животных заражали большими дозировками бактерий и одновременно или спустя недолгое время вводили препараты бактериофагов. В такой схеме эксперимента, когда инфекция не успевала распространиться за пределы места инъекции, животные, по сути, играли роль пробирки. Результаты экспериментов показали, что введение бактериофагов оказывало терапевтический эффект в том случае, если фаги вводили сразу или вскоре после заражения животного. При введении бактериофагов через несколько часов после заражения наблюдаемый эффект был в ряде случаев значительно слабее. Важным неожиданным результатом исследований оказалась сильная дозозависимость действия препаратов бактериофагов. Можно было ожидать, что в организме инфицированных животных фаги будут быстро размножаться в бактериях-хозяевах, и для достижения терапевтического эффекта должны требоваться минимальные дозы фагов. Именно такую возможность упоминают всегда, описывая теоретические преимущества фагов как средств терапии. Однако в экспериментах на животных хороший терапевтический результат наблюдали лишь при введении высоких доз бактериофагов, которые не применяли в известных клинических исследованиях [55, 74, 78–89].

Основные результаты экспериментов на животных – бактериофаги безвредны для организма млекопитающих; бактериофаги эффективно уничтожают бактерии в условиях, когда бактерии им легко доступны (таблица).

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Эффективность лечения бактериофагами обосновывается упоминаниями положительных результатов, описанных в литературе в середине прошлого века, когда не было практики проведения экспериментов с использованием плацебо и контрольных групп, а отрицательные результаты обычно не публиковались [74, 90–93]. Между тем в случае лечения инфекций эффект плацебо может быть велик.

В последние годы интерес к фаготерапии возрос, в том числе и благодаря нескольким широко обсуждавшимся случаям излечения препаратами бактериофагов больных, находившихся в критическом состоянии. Однако значимость этих событий преувеличена прессой; о каждом спасенном бактериофагами пациенте были написаны десятки сообщений, а о неудачных случаях публикаций не было, поскольку для журналистов такие случаи не представляли интереса. Анализ случаев излечения тяжелых больных препаратами бактериофагов показал сложности такого лечения и возникающие проблемы.

Так, описан случай успешного применения фаготерапии для лечения 68-летнего пациента, страдающего диабетом и некротизирующим панкреатитом, осложненным лекарственно-устойчивым штаммом *A. baumannii*. Антибиотикотерапия не помогала, и пациенту провели лечение бактериофагами, подобранными на основе тестирования бактерий, выделенных у самого пациента. Бактериофаги вводили внутривенно и трансдермально в абсцесс. В результате лечения удалось подавить инфекцию *A. baumannii* и добиться выздоровления пациента [14].

Известен еще один случай излечения больного, находившегося в критическом состоянии. Пятнадцатилетнему пациенту с муковисцидозом и диссеминированными микобактериальными абсцессами после трансплантации легких был проведен курс лечения трехкомпонентным фаговым коктейлем. Литические фаги, эффективно убивающие инфекционный штамм *Micobacterium abscessus*, были разработаны методами синтетической биологии. Исследователи отмечали, что внутривенное лечение фагами переносилось хорошо и сопровождалось объективным клиническим улучшением, включая закрытие раны на грудине, улучшение функции

Эксперименты по применению бактериофагов в животных моделях

Модель заболевания	Инфекционный агент	Модельное животное	Способ введения бактериофага	Результат введения бактериофагов	Ссылка
Острый и хронический остеомиелит	*S. aureus*	кролик	инъекция в область поражения	острый остеомиелит – полное излечение; хронический остеомиелит – клиническое улучшение, подтвержденное гистологически	[80]
Раневая инфекция	*S. aureus*, *P. aeruginosa*	свинья, крыса	местное применение коктейля через 4 дня, 10^8–10^9 БОЕ	уменьшение бактериальной нагрузки, значительное улучшение	[83]
Раневая инфекция	MDR *A. baumannii*	крыса	спрей, 3×10^9 БОЕ	уменьшение бактериальной нагрузки и периода эпителизации, сокращение раневой поверхности по сравнению с контрольными животными, получавшими антибиотикотерапию	[84]
Диабетическая стопа	*S. aureus*	мышь	инъекция коктейля из 3-х фагов, 10^8–10^9 БОЕ каждого фага совместно или без антибиотика через 30 мин после заражения	препарат бактериофагов был эффективен в модели диабетической раны и недиабетической раны; антибиотик был неэффективен в модели диабетической стопы	[89]
Ожог	*K. pneumoniae*	мышь	местное применение	результаты фаготерапии были лучше, чем при применении антибиотиков и нитрата серебра	[81]
Абсцесс	*S. aureus*	мышь	подкожное введение однократное или 4 инъекции в день, 10^9 БОЕ	уменьшение размера абсцесса, уменьшение бактериальной нагрузки на 2 порядка (однократное введение) или 4 порядка (4-х кратное введение)	[78]
Абсцесс	*S. aureus*	кролик	подкожное введение через 0, 5, 12 или 24 ч, 5×10^7 БОЕ	отсутствие результата при введении 5×10^7 БОЕ через 5, 12 или 24 ч; уменьшение размера абсцесса, уменьшение бактериальной нагрузки при введении 5×10^9 БОЕ одновременно с заражением	[88]
Кишечная инфекция	*Shigella sonnei*	мышь	пероральное введение коктейля фагов	уменьшение бактериальной нагрузки было эффективнее по сравнению с введением ампициллина	[82]
Инфекция легких	*Burkholderia cepacia*	мышь	ингаляция через нос	уменьшение бактериальной нагрузки	[85]
Инфекция легких	*P. aeruginosa*	мышь	интраназальное введение, $2{,}5 \times 10^7$ БОЕ	при одновременном введении бактерии и фага – отсутствие патогена у 100% мышей; при введении фага через 24 ч после заражения – отсутствие патогена у 86% мышей	[84]
Хроническая инфекция легких	*P. aeruginosa*	мышь	интраназальное введение в различные сроки после заражения	отсутствие патогена у 70% мышей; уменьшение бактериальной нагрузки у 30% мышей	[87]
Хронический отит	*P. aeruginosa*	собака	введение в ухо фагового коктейля (6 фагов, 10^5 БОЕ каждого)	уменьшение бактериальной нагрузки на 30–97% у разных животных	[79]

БОЕ – бляшкообразующие единицы.

печени и заживление воспаленных лимфоузлов кожи [17].

В описанных случаях больные параллельно с бактериофагами по этическим соображениям продолжали получать антибиотики. Потребовалось длительное лечение высокими дозами фагов. Препараты пришлось подбирать, подключая множество организаций, и даже конструировать фаги, используя методы синтетической биологии.

В последние годы был проведен ряд клинических испытаний препаратов бактериофагов, однако не все исследования проводились в соответствии с современными стандартами [94–103]. Только часть этих исследований показала клиническую эффективность фаготерапии [96–98, 103]. К сожалению, результаты большинства других экспериментов нельзя назвать выдающимися. На сегодня основным результатом проведенных клинических испытаний является только то, что бактериофаги действительно безопасны при различных способах введения, в том числе и при внутривенном введении. Новостью это назвать трудно, так как фаги доказали свою безопасность в течение многих десятилетий применения в медицине.

Институт иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук (Вроцлав, Польша) в 2005 г. начал клинические исследования терапии бактериальных инфекций фагами (клиническое исследование № NCT00945087). Результаты данного исследования к настоящему времени не опубликованы.

В 2009 г. компания «BioContol Ltd.» сообщила о положительных результатах лечения фагами инфекции ушей, вызванной *P. aeruginosa* [98]. Позднее эти результаты нигде не упоминались.

Компания «Nestlé» спонсировала испытания в Бангладеш фагового препарата против *E. coli* для лечения диареи у детей [100–102]. Доказательств эффективности фаготерапии получено не было. Неудачу объяснили тем, что только 60% пациентов имели *E. coli* в фекалиях, для остальных пациентов препарат был бесполезен.

Широко обсуждались клинические испытания фагового коктейля, содержащего 12 бактериофагов, для лечения ожоговых ран, инфицированных *P. aeruginosa* и *E. coli*, – «Phagoburn trial» (http://www.phagoburn.eu, European Clinical Trials database, № 2014-000714-65 и Clinical Trials gov, № NCT02116010). Обработка препаратами проводилась местно, ежедневно в течение семи дней. Результаты испытаний не показали эффективного терапевтического действия бактериофагов. Стандартное лечение больных сульфадиазином серебра оказалось эффективнее, чем фаготерапия. Неудачу этих испытаний объяснили нестабильностью фагового препарата и недостаточной концентрацией фагов в препаратах [99].

В 2016–2017 гг. было проведено рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование безопасности и влияния на микробиоту ЖКТ пребиотической добавки «PreforPro», состоящей из четырех бактериофагов (клиническое исследование № NCT03269617, финансированное Университетом Колорадо, США). В ходе исследования были получены данные о безопасности применения бактериофагов и о некоторых статистически достоверных изменениях в микробиоме ЖКТ после приема препарата [104, 105].

В 2017–2018 гг. было проведено рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое клиническое исследование безопасности и эффективности лечения адаптированным препаратом «Пиофаг» инфекций мочевыводящих путей у пациентов, перенесших трансуретральную резекцию предстательной железы. Исследование проводилось на базе Национального центра урологии в Тбилиси, Грузия и финансировалось «Balgrist University Hospital», Швейцария (клиническое исследование № NCT03140085) [106]. В результате была показана безопасность применения препарата и выявлено снижение титров инфекционных бактерий (от 1 до 5 log) у шести из девяти пациентов [107].

Недавно было проведено исследование в «Westmead Hospital», Австралия. Четырнадцати пациентам с инфекционным эндокардитом и сепсисом, вызванным *Staphylococcus*, внутривенно вводили фаговый коктейль AB-SA01, включающий три разных бактериофага производства «AmpliPhi Biosciences», США. Коктейль вводили два раза в день на протяжении двух недель. В результате исследователи наблюдали снижение воспалительных реакций и уменьшение бактериальной нагрузки [103]. Однако контрольной группы в исследовании не было. Компания «AmpliPhi Biosciences» получила разрешение FDA на проведение испытаний внутривенного фагового препарата для лечения гнойных ран и кожных инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA).

На сегодня фаготерапия не является разрешенным для широкого применения методом терапии в США и европейских странах. Вместе с тем в 2018 г. в США был открыт центр IPATH (The Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics), в котором фаготерапия исследуется и применяется как экспериментальный метод лечения (eIND, experimental investigational new drug) в «University of California San Diego

School of Medicine». В Польше в «Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy» применяют фаготерапию в рамках экспериментального лечения в соответствии с Хельсинкской декларацией (Article 37, Unproven Interventions in Clinical Practice of the Declaration of Helsinki, www.wma.net), допускающей применение недоказанных методов терапии для пациентов, которым не помогают официально одобренные препараты и методы лечения [108]. В соответствии с Хельсинкской декларацией возможно проведение терапии бактериофагами и в других европейских странах, однако бюрократический процесс для получения разрешения на экспериментальное лечение не прост. Поэтому в настоящее время пациенты пользуются возможностью получить лечение бактериофагами в Грузии, в Польше, а в последнее время и в США.

ПРОБЛЕМЫ ФАГОТЕРАПИИ

Фаготерапия выглядит как идеальный персонализированный подход к лечению инфекционных заболеваний: принцип действия бактериофагов доказан; в модельных системах показана их эффективность; описаны достоверные случаи, когда терапия бактериофагами была успешной и позволила спасти жизни людей или существенно улучшить их состояние. Бактериофаги безопасны; они классифицированы FDA как «Generally Recognized As Safe» и, следовательно, могут проходить клинические испытания в ряде стран. Однако внедрение фагов в медицинскую практику происходит крайне медленно.

Одна из причин заключается в том, что молекулярные механизмы взаимоотношения бактериофагов с бактериями и их поведение в организме остаются недостаточно изученными. Фаги принципиально отличаются от обычных химиотерапевтических препаратов; они могут размножаться в организме пациента в зависимости от концентрации бактерий-хозяев и изменяться (мутировать), чего не бывает с обычными лекарствами. В связи с этим не ясна ситуация с необходимой дозировкой фаговых препаратов, поскольку если бактериофаг не попадет в соответствующую патогенную бактерию, то его терапевтический эффект буден сведен к нулю. Не вполне изучена фармакокинетика и фармакодинамика бактериофагов. Еще предстоит разработать оптимальные лекарственные формы препаратов на основе бактериофагов для применения при различных типах инфекций.

Не решен практический вопрос о том, каким должен быть одобренный препарат. Должен ли он содержать только конкретные бактериофаги с точно установленной структурой, прошедшие весь комплекс испытаний, как и химические препараты. Или препарат может включать бактериофаги/коктейли бактериофагов, выделенные специально для конкретного пациента. Какова должна быть стандартная процедура подбора препарата бактериофагов для лечения конкретных пациентов, пораженных определенными бактериальными штаммами? Какими должны быть стандартизованные методы очистки бактериофага, гарантированно обеспечивающие его стерильность и безопасность?

Одной из важнейших задач является создание платформ, позволяющих быстро идентифицировать патогенные бактерии и определять их чувствительность к препарату бактериофага. Пока этот процесс занимает не менее 3–5 дней, что во многих случаях недопустимо долго, и лечащему врачу легче немедленно применить антибиотик широкого спектра действия, который с вероятностью 50% подействует на инфекционный агент.

Именно поэтому большие надежды возлагают на применение методов синтетической биологии для получения бактериофагов с заданными свойствами – расширенной специфичностью, повышенной литической активностью, способностью поражать только бактерии, содержащие целевые генетические элементы, например гены, определяющие лекарственную устойчивость. Опубликован ряд работ, демонстрирующих возможности синтетической биологии для получения фагов с измененными отдельными функциями и характеристиками. Однако проблемы, стоящие на пути создания терапевтических бактериофагов, глубоки и многочисленны. Так, в качестве выдающегося примера дизайна высокоспецифичных бактериофагов приводятся работы, в которых фаги были снабжены генами, кодирующими системы геномного редактирования, которые нарушают лишь заданные гены бактерий [109–111]. Однако снабжение фагов этим высокоточным оружием не решает проблемы создания терапевтического препарата. Со специфичностью поражения бактериальных штаммов бактериофагами проблем не было никогда. Наоборот, проблемой является узкая специфичность бактериофагов.

Помимо проблем, связанных с необходимостью глубоких исследований бактериофагов, на пути широкого внедрения фаготерапии существует ряд экономических и бюрократических барьеров.

Интерес фарминдустрии к бактериофагам ограничен в связи с проблемами защиты интел-

лектуальной собственности. Кроме того, из-за узкой специфичности фаговых препаратов и возникновения к ним устойчивости у бактерий зачастую невозможно долгое время применять неизмененный стандартный препарат фага. Чаще всего бактериофаги требуются для применения в критических случаях для относительно узкого круга больных там, где бессильными оказались все виды антибиотиков. По оценкам специалистов, таких случаев в США лишь несколько тысяч в год. Поэтому производство фаговых препаратов для фармацевтических компаний экономически не выгодно.

Принципиальная проблема на пути развития фаготерапии состоит в том, что в большинстве стран разрешительные органы предъявляют к бактериофагам те же требования, что применяются к препаратам на основе химических соединений. Бактериофаги, не являющиеся веществами со строго фиксированной неизменной структурой, в принципе не могут соответствовать этим требованиям. Кроме того, бактериофаги, хотя и не заражают клетки человека, являются вирусами. Само это слово зачастую напрягает медицинских и не медицинских чиновников. При обсуждении возможности использования бактериофагов как терапевтических препаратов выдвигаются надуманные проблемы, опровергнутые многолетним применением бактериофагов в клинике. Повторяются опасения о возможности переноса бактериофагами фрагментов генетического материала между бактериями, хотя организм человека содержит огромное множество разных бактериофагов, и добавление еще одного родственного бактериофага не может создать никаких дополнительных проблем. Тем более что для лечения пациентов не используют бактериофаги, имеющие системы переноса генетических элементов.

В какой-то степени соответствовать стандартным подходам регуляторов могут препараты фиксированного состава – коктейли из определенных детально изученных бактериофагов. Однако такие препараты недостаточно гибки для того, чтобы обеспечивать воздействие на постоянно мутирующие штаммы бактерий. В действительности, в процессе производства препаратов композиция входящих в их состав бактериофагов может изменяться, обеспечивая «адаптацию» препарата к вновь появившимся штаммам инфекционных агентов. Недавние успехи в лечении терминальных пациентов фаговыми препаратами показали, что успешная терапия была достигнута лишь при использовании персонализированных коктейлей фагов и даже подбора или конструирования специальных фагов [14, 17]. Такой вариант фаготерапии также не может пройти сквозь существующие регулирующие барьеры.

Можно отметить, что имеется пример успешного применения упрощенных правил одобрения препаратов. Речь идет о производстве противогриппозных вакцин, которые требуют регулярной модификации.

В сложившейся ситуации в ряде стран предпринимаются попытки разработать специальные правила для препаратов на основе бактериофагов. В Бельгии внедряется подход, основанный на применении бактериофагов как магистральных препаратов [112], которые фармацевты могут составлять по рецепту лечащих врачей для конкретных пациентов из стандартных бактериофагов. В таких препаратах бактериофаги должны соответствовать требованиям фармакопеи. Однако, кроме стандартных бактериофагов, в составе магистральных препаратов могут применяться не авторизованные бактериофаги, получившие сертификат анализа в лабораториях, аккредитованных в Бельгийских регулирующих органах. Магистральные препараты бактериофагов могут использоваться для лечения конкретных пациентов, и ответственность за их применение лежит на лечащем враче и/или фармацевте. В Грузии персонализированные фаговые препараты также могут изготовляться как магистральные в аккредитованных аптеках, получивших лицензии от Министерства здравоохранения Грузии.

В Российской Федерации, лидировавшей в производстве и применении бактериофагов, в настоящее время только препараты бактериофагов, производимые ФГУП НПО «Микроген», распространяются через аптечную сеть и применяются как фармако-терапевтические медицинские иммунобиологические препараты, согласно Государственному реестру Министерства здравоохранения РФ. Препараты других производителей не являются лекарственными средствами. Фаготерапия в РФ не развивается, поскольку в стране не разрешено применение персонализированных методов фаготерапии, а препараты бактериофагов производства ФГУП НПО «Микроген» не входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». Кроме того, стандартные препараты, выпускаемые российскими компаниями, не позволяют реализовать главное преимущество фаготерапии – персонализированный подход.

Очевидно, что бюрократические барьеры должны быть устранены в интересах пациентов. Бактериофаги не представляют опасностей для человека, что доказано их столетним применением в медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фаготерапия – это, очевидно, перспективный подход для лечения бактериальных инфекций. Ее возможности наиболее ярко были продемонстрированы при персонализированном применении, когда для конкретных пациентов, которым не помогла антибиотикотерапия, подбирались специальные коктейли бактериофагов.

Бактериофаги не смогут стать заменой антибиотиков, которые дешевы, обладают широкой специфичностью, оказываются эффективными в большом количестве случаев и поэтому останутся препаратами первого выбора для лечения инфекционных заболеваний. Однако фаги позволяют справляться с тяжелыми инфекциями, не поддающимися терапии антибиотиками, и открывают возможность персонализированной терапии пациентов, позволяющей щадящим образом воздействовать на их микрофлору. Фаготерапия не сможет полностью решить проблему антибиотикоустойчивых инфекционных агентов. Наиболее перспективные приложения фаготерапии связаны с лечением инфекционных поражений, не поддающихся антибиотикотерапии, при которых наиболее адекватным будет местное применение. Кроме того, фаготерапия будет полезна в тех случаях, когда антибиотики вследствие широты их действия могут нарушить микробиоту или негативно повлиять на и без того ослабленный организм пациента с тяжелым заболеванием. Фаги могут успешно применяться в тех местах, куда их легко доставить и откуда они не будут быстро выводиться.

Для создания эффективных препаратов на основе бактериофагов и разработки технологий лечения требуется проведение фундаментальных исследований. Необходимо детально изучить механизмы ко-эволюции фагов и бактерий, фармакодинамику и фармакокинетику фагов в организме; разработать способы конструирования бактериофагов с заданными свойствами с помощью методов синтетической биологии и создать технологии получения стабильных препаратов бактериофагов и средств их доставки. Требуется проведение полноценных клинических испытаний для выяснения вопросов, связанных с изучением дозировок, способов введения и возможных схем терапевтического применения препаратов бактериофагов.

Необходимо организовать широкое международное сотрудничество с целью создания условий, позволяющих быстро получать бактериофаги, которые необходимы для лечения конкретных пациентов.

Существующие подходы к регистрации терапевтических препаратов не применимы к препаратам бактериофагов и полностью закрывают дорогу к развитию фаготерапии, которая наиболее успешно может быть реализована в варианте персонализированной терапии, предусматривающей подбор бактериофагов для лечения конкретного пациента, зараженного определенными бактериями. Для успешного развития фаготерапии, как и для других видов терапии, основанных на применении вирусов, клеток и клеточных продуктов, должны быть созданы новые принципы разрешительных процедур.

Финансирование. Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-29-08015).

Конфликт интересов. Авторы обзора заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д'Эррель Ф. (1935) *Бактериофаг и феномен выздоровления*, Издательство Тифлисского государственного университета, Тифлис.
2. Chanishvili, N. (2012) Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through soviet experience to current approaches, *Adv. Virus Res.*, **83**, 4-40.
3. Покровска М. П., Каганова Л. С., Морозенко М. А., Булгакова А. Г., Скаценко Е. Е. (1941) *Лечение ран бактериофагами*, Медгиз, Москва, Ленинград.
4. Цулукидзе А. П. (1941) К методике применения бактериофага в хирургической практике, *Вестник хирургии*, **6**, 679-685.
5. Кокин Г. А. (1941) Применение бактериофагов в хирургии, *Советская медицина*, **9**, 15-18.
6. Сапир И. Б. (1939) *Наблюдения и замечания по поводу лечения дизентерии бактериофагом*, Издательство Московского областного института инфекционных болезней, Москва.
7. Беликова М. А. (1941) Опыт фагопрофилактики дизентерии детей раннего возраста в Сталинграде, *Ж. Микробиол. Эпидемиол. Иммунол.*, **5-6**, 168-183.
8. Ермольева З. В. (1942) *Холера*, Медгиз, Москва.
9. Жуков-Вережников Н. Н., Пермитина Л. Д., Берилло Э. А., Комиссаров В. П., Бардымов В. М., Хволес А. Г., Угрюмов Л. Б. (1978) Изучение терапевтического эффекта препаратов бактериофага в комплексном лечении гнойных хирургических заболеваний, *Советская медицина*, **12**, 64-66.

10. Кочеткова В. А., Мамонтов А. С., Московцева Р. Л., Ерастова Е. И., Трофимов Е. И., Попов М. И., Джубалиева С. К. (1989) Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных, *Советская медицина*, **6**, 23-26.
11. Брюсов П. Г., Зубрицкий В. Ф., Исламов Р. Н., Низовой А. В., Фоминых В. М. (2011) Фагопрофилактика и фаготерапия хирургических инфекций, *Военно-медицинский журнал*, **4**, 34-39.
12. Хайруллин И. Н., Поздеев О. К., Шаймарданов Р. Ш. (2002) Эффективность применения специфических бактериофагов в лечении и профилактике хирургических и послеоперационных инфекций, *Казанский медицинский журнал*, **83**, 258-261.
13. Morozova, V. V., Kozlova, Y. N., Ganichev, D. A., and Tikunova, N. V. (2018) Bacteriophage treatment of infected diabetic foot ulcers, *Methods Mol. Biol.*, **1693**, 151-158, doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_13.
14. Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., et al. (2017) Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e00954-17. doi: 10.1128/AAC.00954-17.
15. Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Elefteriades, J. A., and Narayan, D. (2018) Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *Evol. Med. Public Health.*, **1**, 60-66, doi: 10.1093/emph/eoy005.
16. Onsea, J., Soentjens, P., Djebara, S., Merabishvili, M., Depypere, M., et al. (2019) Bacteriophage application for difficult-to-treat musculoskeletal infections: development of a standardized multidisciplinary treatment protocol, *Viruses.*, **11**, 891, doi: 10.3390/v11100891.
17. Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., et al. (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*, *Nat. Med.*, **25**, 730-733, doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
18. Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G., et al. (2014) A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes, *Nat. Commun.*, **5**, 4498, doi: 10.1038/ncomms5498.
19. Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., and De Paepe, M. (2020) New insights into intestinal phages, *Mucosal Immunol.*, **13**, 205-215, doi: 10.1038/s41385-019-0250-5.
20. Górski, A., Wazna, E., Dąbrowska, B. W., Dąbrowska, K., Switała-Jeleń, K., and Miedzybrodzki, R. (2006) Bacteriophage translocation, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46**, 313-319, doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x.
21. Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., et al. (2017) Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers, *mBio.*, **8**, e01874-17, doi: 10.1128/mBio.01874-17.
22. Fish, R., Kutter, E., Bryan, D., Wheat, G., and Kuhl, S. (2018) Resolving digital Staphylococcal osteomyelitis using bacteriophage – a case report, *Antibiotics (Basel)*, **7**, 87, doi: 10.3390/antibiotics7040087.
23. Huh, H., Wong, S., St Jean, J., and Slavcev, R. (2019) Bacteriophage interactions with mammalian tissue: therapeutic applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **145**, 4-17, doi: 10.1016/j.addr.2019.01.003.
24. Akturk, E., Oliveira, H., Santos, S. B., Costa, S., Kuyumcu, S., Melo, L. D. R., and Azeredo, J. (2019) Synergistic action of phage and antibiotics: parameters to enhance the killing efficacy against mono and dual-species biofilms, *Antibiotics (Basel)*, **8**, 103, doi: 10.3390/antibiotics8030103.
25. Lin, Y., Chang, R., Britton, W. J., Morales, S., Kutter, E., and Chan, H. K. (2018) Synergy of nebulized phage PEV20 and ciprofloxacin combination against Pseudomonas aeruginosa, *Int. J. Pharm.*, **551**, 158-165, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.024.
26. Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013) Revenge of the phages: defeating bacterial defences, *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 675-687, doi: 10.1038/nrmicro3096.
27. Basu, S., Agarwal, M., Bhartiya, S. K., Nath, G., and Shukla, V. (2015) An *in vivo* wound model utilizing bacteriophage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Ostomy Wound Manage.*, **61**, 16–23.
28. Fong, S. A., Drilling, A., Morales, S., Cornet, M. E., Woodworth, B. A., Fokkens, W. J., Psaltis, A. J., Vreugde, S., and Wormald, P. J. (2017) Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 418, doi: 10.3389/fcimb.2017.00418.
29. Chan, B. K., Abedon, S. T., and Loc-Carrillo, C. (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy, *Future Microbiol.*, **8**, 769-783, doi: 10.2217/fmb.13.47.
30. Yuan, Y., Wang, L., Li, X., Tan, D., Cong, C., and Xu, Y. (2019) Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, *Virus Res.*, **272**, 197734, doi: 10.1016/j.virusres.2019.197734.
31. Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., et al. (2018) Phage therapy: what have we learned? *Viruses*, **10**, 288, doi: 10.3390/v10060288.
32. Łusiak-Szelachowska, M., Zaczek, M., and Weber-Dąbrowska, B. (2014) Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy, *Viral Immunol.*, **27**, 295-304, doi: 10.1089/vim.2013.0128.
33. Majewska, J., Beta, W., Lecion, D., Hodyra-Stefaniak, K., Kłopot, A., et al. (2015) Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood, *Viruses*, **7**, 4783-99, doi: 10.3390/v7082845.
34. Hodyra-Stefaniak, K., Miernikiewicz, P., Drapała, J., Drab, M., Jończyk-Matysiak, E. J., et al. (2015) Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate *in vivo*, *Sci. Rep.*, **5**, 14802, doi: 10.1038/srep14802.
35. Górski, A., Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Dąbrowska, K., Wierzbicki, P., et al. (2012) Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy, *Adv. Virus Res.*, **83**, 41-71, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5.
36. Górski, A., Międzybrodzki, R., Jończyk-Matysiak, E., Żaczek, M., and Borysowski, J. (2019) Phage-specific diverse effects of bacterial viruses on the immune system, *Future Microbiol.*, **14**, 1171-1174, doi: 10.2217/fmb-2019-0222.
37. Sinha, A., and Maurice, C. F. (2019) Bacteriophages: uncharacterized and dynamic regulators of the immune system, *Mediators Inflamm.*, **2019**, 3730519, doi: 10.1155/2019/3730519.
38. Van Belleghem, J. D., Dąbrowska, K., Vaneechoutte, M., Barr, J., and Bollyky, P. (2018) Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system, *Viruses*, **11**, 10, doi: 10.3390/v11010010.
39. Dąbrowska, K., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Hodyra, K., Owczarek, B., Lecion, D., Kaźmierczak, Z., Letarov, A., and Górski, A. (2014) Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface, *J. Virol.*, **88**, 12551-12557, doi: 10.1128/JVI.02043-14.

40. Zaczek, M., Łusiak-Szelachowska, M., Jończyk-Matysiak, E., Weber-Dąbrowska, B., Miedzybrodzki, R., et al. (2016) Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy, *Front. Microbiol.*, **7**, 1-14, doi: 10.3389/fmicb.2016.01681.
41. Dąbrowska, K. (2019) Phage therapy: what factors shape phagepharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review, *Med. Res. Rev.*, **1**, 1-26, doi: 10.1002/med.21572.
42. Bochkareva, S. S., Aleshkin, A. V., Ershova, O. N., Novikova, L. I., Karaulov, A. V., et al. (2017) Anti-phage antibody response in phage therapy against healthcare-associated infections (HAIs), *Infectious diseases*, **15**, 35-40, doi: 10.20953/1729-9225-2017-1-35-40.
43. Weber-Dąbrowska, B., Zimecki, M., and Mulczyk, M. (2000) Effective phage therapy is associated with normalization of cytokine production by blood cell cultures, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **48**, 31-37.
44. Roach, D. R., Chollet-Mmartin, S., Noël, B., and Granger, V., Debarbieux, L., and de Chaisemartin, L. (2019) Human neutrophil response to Pseudomonas bacteriophages, *bioRxiv*, 1-10, doi: 10.1101/786905.
45. Roach, D. R., Leung, C. Y., Henry, M., Morello, E., Singh, D., Di Santo, J. P., Weitz, J. S., and Debarbieux, L. (2017) Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen, *Cell Host Microbe*, **22**, 38-47.e4, doi: 10.1016/j.chom.2017.06.018.
46. Dickey, J., and Perrot, V. (2019) Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*, *PLoS One*, **14**, e0209390, doi: 10.1371/journal.pone.0209390.
47. Rodriguez-Gonzalez, R. A., Leung, C. Y., Chan, B. K., Turner, P. E., and Weitz, J. S. (2020) Quantitative models of phage-antibiotic combination therapy, *mSystems*, **5**, e00756-19, doi: 10.1128/mSystems.00756-19.
48. Poglazov, B. F. (1973) *Morphogenesis of T-even bacteriophages*, Karger Publishers.
49. Летаров А. В. (2019) *Современные концепции биологии бактериофагов*, ДеЛи, Москва.
50. Тикунова Н. В., Ворошилова Н. Н., Полыгач О. А., Морозова В. В., Тикунов А. Ю., Курильщиков А. М., Власов В. В. (2016) Генетическая характеристика и спектр антибактериальной активности бактериофагов, входящих в состав промышленных серий лекарственного препарата Пиобактериофаг поливалентный очищенный, *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, **15**, 93-100, doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-2-93-100.
51. Полыгач О. А., Ворошилова Н. Н., Тикунова Н. В., Морозова В. В., Тикунов А. Ю., Крылов В. Н., Юнусова А. А., Дабижева А. Н. (2018) Современные подходы к способам создания фаговой основы лечебно-профилактического препарата бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*, **2**, 37-45, doi: 10.24411/2073-3046-2018-10004.
52. Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., et al. (2017) Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **249**, 100-133, doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
53. Manohar, P., and Ramesh, N. (2019) Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages, *Sci. Rep.*, **9**, 15242, doi: 10.1038/s41598-019-51742-4.
54. Chadha, P., Katare, O. P., and Chhibber, S. (2017) Liposome loaded phage cocktail: Enhanced therapeutic potential in resolving *Klebsiella pneumoniae* mediated burn wound infections, *Burns*, **43**, 1532-1543, doi: 10.1016/j.burns.2017.03.029.
55. Chang, R. Y. K., Wallinb, M., Lina, Y., Leung, S. S. Y., Wang, Y., Morales, S., and Chan, H.-K. (2018) Phage therapy for respiratory infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **133**, 76-86, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.001.
56. Otero, J., García-Rodríguez, A., Cano-Sarabia, M., Maspoch, D., Marcos, R., Cortés, P., and Llagostera, M. (2019) Biodistribution of liposome-encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy, *Front. Microbiol.*, **10**, 689, doi: 10.3389/fmicb.2019.00689.
57. Singla, S., Harjai, K., Katare, O. P., and Chhibber, S. (2016) Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies, *PLoS One*, **11**, e0153777, doi: 10.1371/journal.pone.0153777.
58. Kim, K. P., Cha, J. D., Jang, E. H., Klumpp, J., Hagens, S., Hardt, W.-D., Lee, K.-J., Loessner, M. J. (2008) PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response, *Microb. Biotechnol.*, **1**, 247-257, doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00028.x.
59. Rita Costa, A., Milho, C., Azeredo, J., and Pires, D. P. (2018) Synthetic biology to engineer bacteriophage genomes, *Methods Mol. Biol.*, **1693**, 285-300, doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_21.
60. Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., and Lu, T. K. (2016) Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 523-543, doi: 10.1128/MMBR.00069-15.
61. Ando, H., Lemire, S., Pires, D. P., and Lu, T. K. (2015) Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing, *Cell Syst.*, **1**, 187-196, doi: 10.1016/j.cels.2015.08.013.
62. Lu, T. K., and Koeris, M. S. (2011) The next generation of bacteriophage therapy, *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 524-531, doi: 10.1016/j.mib.2011.07.028.
63. Kilcher, S., Studer, P., Muessner, C., Klumpp, J., and Loessner, M. J. (2018) Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 567-572, doi: 10.1073/pnas.1714658115.
64. Lu, T. K., and Collins, J. J. (2007) Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11197-11202, doi: 10.1073/pnas.0704624104.
65. Cobb, L. H., Park, J., Swanson, E. A., Beard, M. C., McCabe, E. M., Rourke, A. S., Seo, K. S., Olivier, A. K., and Priddy, L. B. (2019) CRISPR-Cas9 modified bacteriophage for treatment of *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis and soft tissue infection, *PLoS One*, **14**, e0220421, doi: 10.1371/journal.pone.0220421.
66. Yehl, K., Lemire, S., Yang, A. C., Ando, H., Mimee, M., Der Torossian Torres, M., de la Fuente-Nunez, C., and Lu, T. K. (2019) Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis, *Cell*, **179**, 459-469, doi: 10.1016/j.cell.2019.09.015.
67. Barr, J. J. (2017) A bacteriophages journey through the human body, *Immunol. Rev.*, **279**, 106-122, doi: 10.1111/imr.12565.
68. Cooper, C. J., Denyer, S. P., and Maillard, J. Y. (2014) Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery, *Lett. Appl. Microbiol.*, **58**, 118-122, doi: 10.1111/lam.12161.
69. Carrigy, N. B., Chang, R.Y., Leungm, S. S. Y., Harrison, M., Petrova, Z., et al. (2017) Anti-tuberculosis bacteriophage D29 delivery with a vibrating mesh nebulizer, jet nebulizer, and soft mist inhaler, *Pharm. Res.*, **34**, 2084-2096, doi: 10.1007/s11095-017-2213-4.
70. Astudillo, A., Leung, S. S. Y., Kutter, E., Morales, S., and Chan, H. K. (2018) Nebulization effects on structural sta-

bility of bacteriophage PEV 44, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **125**, 124-130, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.01.010.
71. Самохин А. Г., Козлова Ю. Н., Корнеев Д. В., Таранов О. С., Фёдоров Е. А., Павлов В. В., Морозова В. В., Тикунова Н. В. (2018) Экспериментальное исследование антибактериальной активности литического стафилококкового бактериофага ph20 и литического бактериофага синегнойной палочки ph57 при моделировании их импрегнации в ортопедические полимерные конструкции из полиметилметакрилата (костного цемента), *Вестник РАМН*, **73**, 59-68, doi: 10.15690/vramn905.
72. Алешкин А. В., Зулькарнеев Э. Р., Киселева И. А., Емельяненко К. А., Емельяненко А. М., Бойнович Л. Б. (2018) Опыт использования органо-неорганических гибридных покрытий с сорбированными бактериофагами для снижения риска развития STEC-инфекций, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **165**, 473-476.
73. Morris, J., Kelly, N., Elliott, L., Grant, A., Wilkinson, M., Hazratwala, K., and McEwen, P. (2019) Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by *Staphylococcus aureus*, *Surg. Infect. (Larchmt)*, **20**, 16-24, doi: 10.1089/sur.2018.135.
74. Gelman, D., Eisenkraft, A., Chanishvili, N., Nachman, D., Glazer, C. S., and Hazan, R. (2018) The history and promising future of phage therapy in the military service, *J. Trauma Acute Care Surg.*, **85**, S18-S26, doi: 10.1097/TA.0000000000001809.
75. Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., and Turner, P. E. (2019) Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria, *Cell Host Microbe*, **25**, 219-232, doi: 10.1016/j.chom.2019.01.014.
76. Abedon, S. T. (2019) Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **145**, 18-39, doi: 10.1016/j.addr.2018.06.018.
77. Principi, N., Silvestri, E., and Esposito, S. (2019) Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections, *Front. Pharmacol.*, **10**, 513, doi: 10.3389/fphar.2019.00513.
78. Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., and Iannelli, D. (2007) Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 2765-2773.
79. Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Anggard, E., and Soothill, J. (2010) Topical treatment of Pseudomonas aeruginosa otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial, *Vet. Microbiol.*, **145**, 309-313.
80. Kishor, C., Mishra, R. R., Saraf, S. K., Kumar, M., Srivastav, A. K., and Nath, G. (2016) Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model, *Indian J. Med. Res.*, **143**, 87-94.
81. Kumari, S., Harjai, K., and Chhibber, S. (2011) Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055, *J. Med. Microbiol.*, **60**, 205-210.
82. Mai, V., Ukhanova, M., Reinhard, M. K., Li, M., and Sulakvelidze, A. (2015) Bacteriophage administration significantly reduces Shigella colonization and shedding by Shigella-challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota, *Bacteriophage*, **5**, e1088124.
83. Mendes, J. J., Leandro, C., Corte-Real, S., Barbosa, R., Cavaco-Silva, P., Melo-Cristino, J., Gorski, A., and Garcia, M. (2013) Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds, *Wound Repair Regen.*, **21**, 595-603.
84. Pabary, R., Singh, C., Morales, S., Bush, A., Alshafi, K., et al. (2016) Antipseudomonal bacteriophage reduces infective burden and inflammatory response in murine lung, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 744-751.
85. Semler, D. D., Goudie, A. D., Finlay, W. H., and Dennis, J. J. (2014) Aerosol phage therapy efficacy in *Burkholderia cepacia* complex respiratory infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 4005-4013.
86. Shivaswamy, V. C., Kalasuramath, S. B., Sadanand, C. K., Basavaraju, A. K., Ginnavaram, V., Bille, S., Ukken, S. S., and Pushparaj, U. N. (2015) Ability of bacteriophage in resolving wound infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats, *Microb. Drug Resist.*, **21**, 171-177.
87. Waters, E. M., Neill, D. R., Kaman, B., Sahota, J. S., Clokie, M. R., Winstanley, C., and Kadioglu, A. (2017) Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*, *Thorax*, **72**, 666-667.
88. Wills, Q. F., Kerrigan, C., and Soothill, J. S. (2005) Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 1220-1221.
89. Albac, S., Medina, M., Labrousse, D., Hayez, D., Bonnot, D., et al. (2020) Efficacy of bacteriophages in a *Staphylococcus aureus* nondiabetic or diabetic foot infection murine model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e01870-19, doi: 10.1128/AAC.01870-19.
90. Morozova, V. V., Vlassov, V. V., and Tikunova, N. V. (2018) Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans, *Front. Microbiol.*, **9**, 1696, doi: 10.3389/fmicb.2018.01696.
91. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. (2001) Bacteriophage therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 649-659, doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
92. Chanishvili, N. (2009) *A literature review of the practical application of bacteriophage research*, Nova Science Publishers, New York.
93. Chanishvili, N. (2016) Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: summary of the soviet and post-soviet experiences, *Curr. Drug Deliv.*, **13**, 309-323, doi: 10.2174/1567201813031605201939 46.
94. Schmidt, C. (2019) Phage therapy's latest makeover, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 58-586, doi: 10.1038/s41587-019-0133-z.
95. Altamirano, F., and Barr, J. (2019) Phage therapy in the postantibiotic era, *Clin. Microbiol. Rev.*, **32**, e00066-18, doi: 10.1128/CMR.00066-18.
96. Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., and Sulakvelidze, A. (2009) Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial, *J. Wound Care*, **18**, 240-243.
97. Markoishvili, K., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Morris, J. G., and Sulakvelidze, A. (2002) A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds, *Int. J. Dermatol.*, **41**, 453-458, doi: 10.1046/j.1365-4362.2002.01451.x.
98. Wright, A., Hawkins, C. H., Anggård, E. E., and Harper, D. R. (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy, *Clin. Otolaryngol.*, **34**, 349-357, doi: 10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x.
99. Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., et al. (2018) Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial, *Lancet Infect. Dis.*, **19**, 35-45, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1.

100. Sarker, S. A., McCallin, S., Barretto, C., Berger, B., Pittet, A. C., et al. (2012) Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh, *Virology*, **434**, 222-232, doi: 10.1016/j.virol.2012.09.002.
101. Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., et al. (2016) Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh, *EBioMedicine*, **4**, 124-137, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.12.023.
102. McCallin, S., Sarker, S. A., and Barretto, C. (2013) Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects, *Virology*, **443**, 187-196, doi: 10.1016/j.virol.2013.05.022.
103. Petrovic Fabijan, A., Lin, R. C. Y., Ho, J., Maddocks, S., Ben Zakour, N. L., and Iredell, J. R. (2020) Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection, *Nat. Microbiol.*, **5**, 465-472, doi: 10.1038/s41564-019-0634-z.
104. Febvre, H. P., Rao, S., Gindin, M., Goodwin, N. D. M., Finer, E., et al. (2019) PHAGE study: effects of supplemental bacteriophage intake on inflammation and gut microbiota in healthy adults, *Nutrients*, **11**, E666, doi: 10.3390/nu11030666.
105. Gindin, M., Febvre, H. P., Rao, S., Wallace, T. C., and Weir, T. L. (2019) Bacteriophage for gastrointestinal health (PHAGE) study: evaluating the safety and tolerability of supplemental bacteriophage consumption, *J. Am. Coll. Nutr.*, **38**, 68-75, doi: 10.1080/07315724.2018.1483783.
106. Leitner, L., Sybesma, W., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkhotua, A., et al. (2017) Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial, *BMC Urol.*, **17**, 90, doi: 10.1186/s12894-017-0283-6.
107. Ujmajuridze, A., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Leitner, L., Mehnert, U., Chkhotua, A., Kessler, T. M., and Sybesma, W. (2018) Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections, *Front. Microbiol.*, **9**, 1832, doi: 10.3389/fmicb.2018.01832.
108. Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Wojciech Fortuna, W., Letkiewicz, S., et al. (2012) Clinical aspects of phage therapy, *Adv. Virus Res.*, **83**, 73-121, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7.
109. Goren, M., Yosef, I., and Qimron, U. (2017) Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system, *Drug Resist. Updat.*, **30**, 1-6, doi: 10.1016/j.drup.2016.11.001.
110. Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., and Seo, K. S. (2017) Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*, *Sci. Rep.*, **7**, 44929, doi: 10.1038/srep44929.
111. Pursey, E., Sünderhauf, D., Gaze, W. H., Westra, E. R., and Van Houte, S. (2018) CRISPR-Cas antimicrobials: challenges and future prospects, *PLoS Pathog.*, **14**, e1006990, doi: 10.1371/journal.ppat.1006990.
112. Pirnay, J. P., Verbeken, G., Ceyssens, P. J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., and Fauconnier, A. (2018) The magistral phage, *Viruses*, **10**, 64, doi: 10.3390/v10020064.

BACTERIOPHAGES AS THERAPEUTIC PREPARATIONS: WHAT RESTRICTS THEIR APPLICATION IN MEDICINE

Review

V. V. Vlassov*, N. V. Tikunova, and V. V. Morozova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: vvlassov@mail.ru

Received June 15, 2020
Revised August 18, 2020
Accepted August 18, 2020

The increasing prevalence of bacterial pathogens with multiple antibiotic resistance requires development of new approaches to control infections. Phage therapy is one of the most promising approaches. In recent years, research organizations and a number of pharmaceutical companies have intensified investigations aimed at developing bacteriophage-based therapeutics. In the United States and European countries, special centers have been established that experimentally apply phage therapy to treat patients who do not respond to antibiotic therapy. This review describes the features of bacteriophages as therapeutic tools, critically discusses the results of clinical trials of bacteriophage preparations, and assesses the prospects for using phage therapy to treat certain types of infectious diseases.

Keywords: bacteriophages, phage therapy, bacterial infections, multidrug resistance, synthetic bacteriophages

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1601 – 1614

УДК 579.6; 577.18

АНТИБИОТИКИ ИЗ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ

Обзор

© 2020 В.А. Стоник*, Т.Н. Макарьева, Л.К. Шубина

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, 690022 Владивосток, Россия; электронная почта: stonik@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 03.07.2020
После доработки 05.08.2020
Принята к публикации 05.08.2020

В обзорной статье рассмотрены основные направления и результаты изучения антибиотиков, продуцируемых бактериями, обитающими в морской среде. Показано, что за последние годы изучено много облигатно морских видов и штаммов, из экстрактов которых получены разнообразные по своему строению, часто не имеющие аналогов, токсичные для опухолевых клеток, патогенных бактерий, вирусов и малярийного плазмодия метаболиты. Некоторые из них стали основой применяемых в клинике медицинских препаратов, другие – находятся на разных этапах доклинических или клинических исследований. Большое внимание уделяют в последние годы продуцентам морских антибиотиков, выделенным из глубоководных мест обитания, с поверхности морских беспозвоночных и водорослей, а также из симбионтных микроорганизмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: морские бактерии, антибиотики, цитотоксическое действие, противобактериальное действие, антифунгальное действие, противовирусное действие, противопаразитарное действие.

DOI: 10.31857/S032097252011007X

ВВЕДЕНИЕ

Открытие и широкое применение антибиотиков имело огромное значение для судьбы человечества и резко уменьшило число жертв эпидемий, которые на протяжении многих столетий уносили жизни миллионов людей. Считается, что это стало одной из главных причин увеличения средней продолжительности жизни. Например, в России в конце 19-го века она составляла около 30 лет, к 1961–1962 гг. выросла до 67,85 г., а в наше время равняется приблизительно 73,4 г. (2018 г.). Однако основной природный источник антибиотиков – почвенные микроорганизмы – к настоящему времени в существенной мере исчерпал свой потенциал, а число новых антибиотиков, выделяемых из почвенных бактерий, уменьшилось.

В то же время изыскание новых антибиотиков остается актуальной задачей из-за увеличивающегося числа случаев тяжелых инфекций, вызываемых различными патогенами, в первую очередь лекарственно-устойчивыми штаммами. Так, растет число жертв лекарственно-устойчивого туберкулеза. В 2017 г. туберкулезом болели 10 млн человек, а 1,6 млн человек (в том числе 0,3 млн человек с ВИЧ) умерли от этой болезни [1]. В 2008 г. была объявлена группа возбудителей тяжелых инфекций, которая получила название «ESKAPE BUGS» («избегающие ошибок»), а само слово «ESKAPE», созвучное английскому «ESCAPE» (избегать), в этом наборе слов было составлено из первых букв латинских названий нечувствительных к антибиотикам возбудителей: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. Позже действие этих патогенов было более детально охарактеризовано [2]. Еще позже выросла угроза заражения антибиотико-устойчивыми штаммами еще нескольких патогенных бактерий, в том числе *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae* и др. [3].

Острая необходимость поиска новых антибиотиков вынудила обратить внимание на трудные для изучения природные источники этих биологически активных веществ, в особенности на морские микроорганизмы – на бактерии и микроскопические грибы, обитающие в экстремальных условиях – так называемые экстремофилы (барофилы, психрофилы, термофилы и др.), а также на эпифитную и симбиотическую микробиальные флоры беспозвоночных и водорослей. Применяя новые возможности поиска антибиотиков, в том числе спускаемые подводные аппараты и научные корабли, учёные исследовали противобактериальные, антифунгальные, противовирусные веще-

* Адресат для корреспонденции.

ства и соединения, ингибирующие патогенных простейших, из таких нетрадиционных продуцентов антибиотиков, как животные, особенно морские беспозвоночные, как обитатели подводных горячих источников; искали эти вещества в Арктике и Антарктиде, на максимальных глубинах океана, в глубоких пещерах и пустынях. В результате была найдена серия веществ, обладающих противопатогенными свойствами, которые можно рассматривать в качестве лидерных соединений при создании новых медицинских препаратов.

К настоящему времени опубликованы несколько обзорных статей о различных аспектах поиска антибиотиков, выделенных из морских микроорганизмов [4–10], а более сотни таких соединений были открыты и описаны. Появились и обзоры результатов поиска метаболитов, ингибирующих метициллин-резистентные *S. aureus* [11] и ванкомицин-резистентные энтерококки [11, 12].

Хотя значительное число морских микроорганизмов пока не удается культивировать, те из них, которые все же были изучены, часто отличаются от своих наземных аналогов рядом физиологических и морфологических особенностей, которые помогают им адаптироваться и выживать в условиях морей и океанов. Среди морских микроорганизмов много ранее неизвестных видов, родов и даже семейств бактерий, и их открытие сильно изменило современную микробиологию.

Например, несколько сотен новых видов бактерий были валидно описаны учеными из нашего Института под руководством чл.-корр. РАН Валерия Викторовича Михайлова. Как и другие морские бактерии, они продуцируют самые разнообразные биоактивные метаболиты [10, 13]. Первым валидно описанным новым видом гетеротрофных бактерий на Дальнем Востоке России стал вид *Alteromonas fuliginea* (типовой штамм КММ 216Т), обитающий в водах залива Петра Великого (1995 г.). Позже этот вид был перенесён в появившийся к тому времени род *Pseudoalteromonas* и включён в вид *Pseudoalteromonas citrea*. За последующие 10 лет были открыты *Marinomonas primoryensis* sp. nov. (назван в честь Приморья), *Vitellibacter vladivostokensis* gen. nov., sp. nov. (назван в честь Владивостока), *Arenibacter troitsensis* sp. nov. (в честь бухты Троицы, в водах которой обитает этот вид, и на берегах которой расположена Морская экспериментальная станция (МЭС) ТИБОХ ДВО РАН), *Mesonia algae* gen. nov., sp. nov. (в честь МЭС), *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov. (эти бактерии были изолированы из образца морской воды Амурского залива), *Reinekea marinisedimentorum* gen. nov., sp. nov. (в честь острова Рейнеке, близ которого из песчаного грунта на небольшой глубине были выделены соответствующие микроорганизмы) и другие. Только за период 1995–2005 гг. в лаборатории микробиологии нашего Института были открыты более 100 новых видов, около 40 новых родов и одно новое семейство морских бактерий [13]. Некоторые из них продуцируют разнообразные биоактивные соединения, в том числе антибиотики [14]. К настоящему времени число новых видов и родов в коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН существенно увеличилось.

Тем не менее не так давно, в 1996 г., только 7 родов бактерий считались исключительно морскими, в том числе *Oceanospirillum, Marinomonas, Planococcus, Listonella, Leucothrix, Platobacterium* и *Prochloron* [5]. Многие из них ассоциированы с морскими рыбами, беспозвоночными или водорослями. Затем ситуация изменилась, и число таких родов увеличилось. Более того, были найдены таксоны более высокого таксономического ранга, все представители которых являются облигатно морскими.

С другой стороны, даже в тех случаях, когда среди морских бактерий обнаруживали известные в наземной среде виды, их в большинстве случаев нельзя было считать просто смытыми с суши и сохранившими в новой среде свои свойства. Адаптация к морской среде часто приводит к отбору таких метаболических путей, которые ведут к ранее неизвестным метаболитам, что объясняет значительное биохимическое разнообразие в этих микроорганизмах и способствует их изучению в качестве новых источников антибиотиков.

Актинобактерии являются наиболее известными бактериальными продуцентами антибиотиков. Они относятся к семейству Actinomycetaceae, включающему роды *Streptomyces*, *Actinobaculum*, *Actinomyces* и другие. Большинство этих грамположительных бактерий продуцируют вещества с уникальным химическим строением токсичные для других бактерий, в том числе патогенных. Более 60% всех производимых фармацевтической промышленностью антибиотиков получают при культивировании актинобактерий [15, 16]. Среди них – стрептомицин, актиномицин, стрептотрицин, цефамицины, полиены, тетрациклины, макролиды и другие лекарственные препараты. Считают, что каждый штамм актинобактерий благодаря своему генетическому потенциалу способен к биосинтезу 15–25 различных вторичных метаболитов. Рассчитано, что около 10 тыс. новых биоактивных веществ самого различного происхождения будет найдено в актинобактериях [16].

На протяжении многих десятков лет для поиска и создания антибиотиков применяли наземные источники – главным образом почвенные микроорганизмы. Хотя ещё в 1969 г. появилось сообщение о выделении первой мицелийформирующей актинобактерии из морских донных осадков [17]. Более того, высказывались предположения о том, что морские антибиотики, в том числе выделенные из симбионтных микроорганизмов морских беспозвоночных, будут иметь преимущество при создании новых лекарств [17, 18].

Среди различных родов актинобактерий род *Streptomyces* представляет особый интерес, потому что именно он оказался источником более половины всех применяемых сейчас в клинической практике антибиотиков. В Genome OnLine Database зарегистрированы 5200 геномов таких бактерий [19]. Интересно, что за последние годы были открыты новые виды этого рода, которые можно считать исключительно морскими стрептомицетами [20]. Более того, 5 новых родов морских актиномицетов были недавно описаны: *Marinactinospora* [21], *Jonesia* [22], *Salinibacterium* [23], *Sciscionella* [24] и *Salinispora* [25]. Немало открыто и бактерий, принадлежащих к другим таксономическим группам, в них также найдены высокоактивные вторичные метаболиты.

В этой небольшой обзорной статье мы приведем сведения об основных направлениях поиска морских антибиотиков и проиллюстрируем эти направления только небольшим числом примеров перспективных морских антибиотиков, группируя их по ингибирующему действию в отношении опухолевых клеток, болезнетворных бактерий, грибов и других патогенов.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АНТИБИОТИКИ ИЗ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОРСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ

Поиск морских антибиотиков, обладающих ингибирующим действием на опухолевые клетки, в последние годы активно проводят в нескольких странах, в особенности в США и Японии. Большое внимание микробиологов, химиков-биооргаников и фармакологов привлекли бактерии рода *Salinispora*. Их культивирование было впервые выполнено в 1989 г. после выделения из образцов донных осадков, собранных на глубине 1100 метров. Оказалось, что, первоначально отнесенные к роду *Micromonospora*, эти бактерии не культивируются, если в средах морская вода была заменена обычной деионизованной водой. Как *Salinispora* они были описаны в 2005 г. [25]. После того как методика культивирования была отработана, *Salinispora* spp. были найдены также в некоторых морских беспозвоночных (губки, асцидии) и в водорослях. Бактерии этого рода оказались облигатно морскими видами, а их дальнейшее изучение привело к открытию нескольких антибиотиков, проявляющих сильное противоопухолевое действие [26].

Первые интересные метаболиты из бактерий этого вида были получены, когда для их выделения использовали бактерии, полученные из предварительно нагретого образца донных осадков. Основное полученное вещество было названо салиноспорамидом A (1) [27]. Этот новый антибиотик имеет скелетную систему, состоящую из γ-лактама и β-лактона (рис. 1), и обладает цитотоксическими свойствами в отношении опухолевых клеток. Хотя его циклическая система идентична таковой омуралида (2), выделенного японскими микробиологами в 1991 г. из *Streptomyces lactacystennaosus*, он существенно отличается от омуралида своими заместителями и их положением. Салиноспорамид A оказался мощным и селективным ингибитором протеасом, он приблизительно в 35 раз более активен в этом тесте, чем омуралид. Антибиотик ингибирует клеточные линии рака легкого NCI-H226, опухоли головного мозга SF-539, меланом SK-MEL-28 и MDA-MB-43, причем все значения IC_{50} (концентрация, ингибирующая клетки на 50%) в этих тестах были меньше 10 нМ. Салиноспорамид успешно показал себя как противораковый агент в доклинических испытаниях и проходит клинические испытания на людях в качестве средства для лечения меланомы. Соответствующий препарат под названием Marizomib разрабатывается «Nereus Pharmaceutical» (Сан Диего, США) по лицензии, полученной от Калифорнийского университета в Сан Диего.

Различные штаммы *Salinispora* spp. продуцируют и другие антибиотики. Так, изучение штамма *S. tropica* CNB-392 привело к выделению салиноспорамидов B (3) и C (4), а замена в среде NaCl на NaBr – к выделению соединения (5) (рис. 1), имеющему атом брома вместо хлора в боковой цепи и сохраняющему цитотоксические свойства [28, 29].

Перспективны для лечения опухолевых заболеваний циклические пептиды из бактерии *Streptomyces* sp. (штамм CNQ-593) из морских донных осадков, собранных на глубине 20 метров недалеко от острова Гуам. Эти вещества были названы пиперазимицинами и имеют формулы 6–8 (рис. 1) [30]. Пиперазимицины проявляют сильные токсические свойства в отношении опухолевых клеток. Среднее значение ингиби-

рующей рост клеток концентрации (GC_{50}) после тестирования на 60 линиях опухолевых клеток, предоставленных Национальным Институтом Рака США, было равно приблизительно 100 нМ.

Во многих случаях высокоактивные метаболиты из морских бактерий проявляют как цитотоксические, так и противобактериальные свойства, хотя чувствительность к ним опухолевых клеток и патогенных бактерий может быть различной. Например, новые производные ауреоловой кислоты, хромомицины A_2–A_4 (9–11) (рис. 1), полученные из *Streptomyces* sp. (штамм KM 9048 из нашей коллекции, который был выделен из образца донных осадков, собранного в

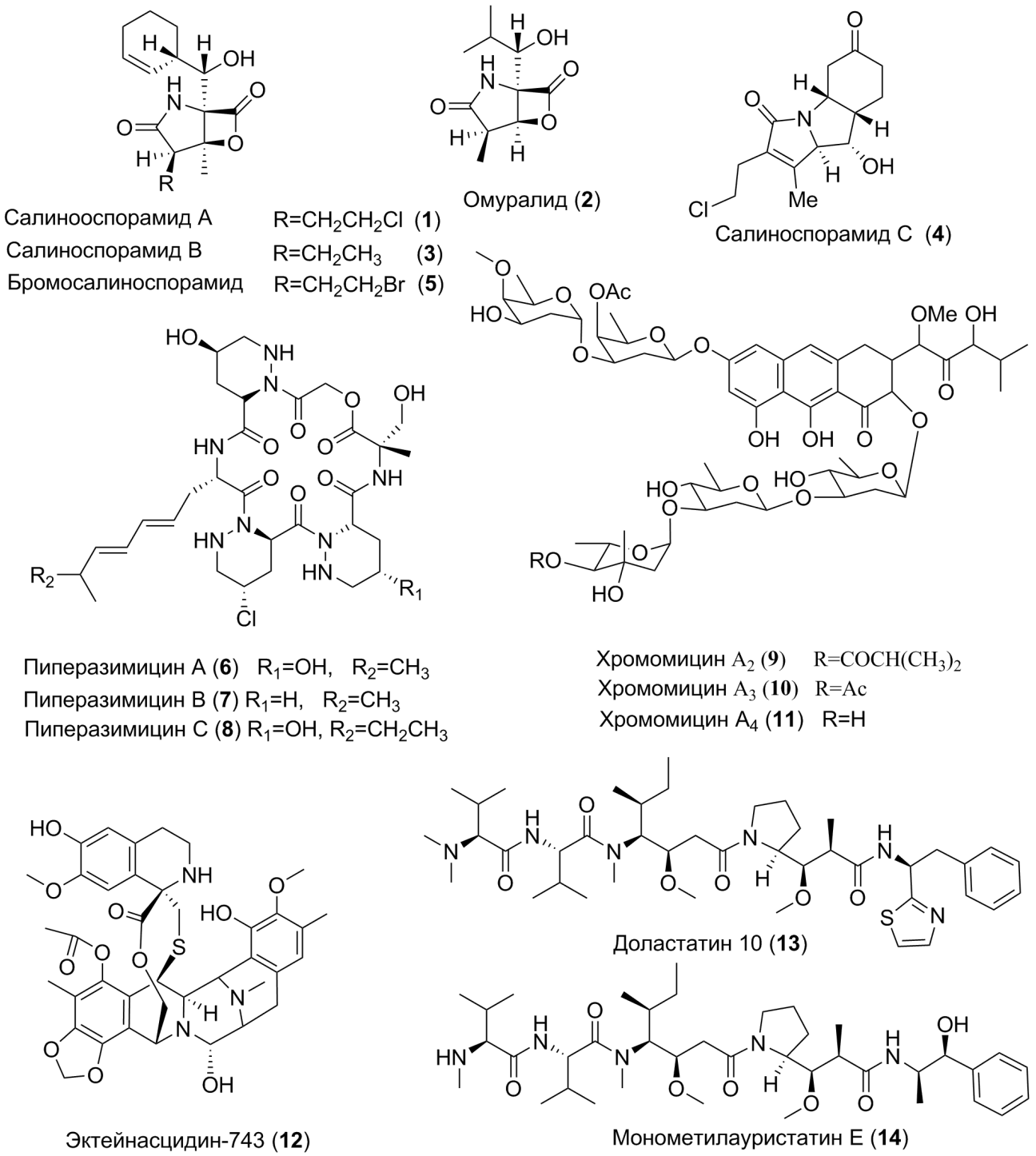


Рис. 1. Некоторые цитотоксические метаболиты морских бактерий

западной части Японского моря), показывали сильное противобактериальное действие против *E. faecium*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermis* и *Bacillus subtilis*. Но их ингибирующие концентрации в отношении опухолевых клеток были еще более низкими, в особенности концентрации, ингибирующие образование микроколоний опухолевых клеток RPMI-7951 и SK-Mel-28 (10–20 нМ) [31].

Морское изохинолиновое производное, эктейнасцидин-743 (ET-743) (рис. 1) (12), стало активной субстанцией нового морского противоракового препарата Трабектедин (Yondelis^{R}), разработанного сотрудниками испанской компании «PharmaMar» (производитель – «Baxter oncology GmbH», Германия). Само это вещество было открыто в США в Иллинойском университете проф. К. Ринехартом. Ему удалось выделить его из асцидии *Ecteinascidia turbinata* и показать очень высокую противоопухолевую активность [32]. Нобелевский лауреат Элиас Кори синтезировал соединение **12**, а позже его удалось получить из антибиотика суфрацина B. С 2007 г. Трабектедин применяется в клинической практике для лечения сарком, рака яичников и других злокачественных опухолей.

Недавно было найдено, что в этой асцидии содержится консорциум различных симбионтных бактерий, причем основным видом в нем является γ-протеобактерия *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis*. Применение Meta-Omics техники позволило охарактеризовать этот консорциум и выявило 25 генов, катализирующих образование ET-743. Последующее секвенирование показало, что истинным продуцентом активной субстанции препарата Трабектедин является эта симбионтная бактерия [33].

На первом месте по распространенности среди симбионтных бактерий беспозвоночных находятся актинобактерии, они, по-видимому, участвуют в биосинтезе многих метаболитов морских беспозвоночных, в том числе нашедших применение в качестве активных субстанций лекарств [34]. В морских беспозвоночных найдены и другие симбионтные бактерии. Например, в губках присутствует еще одна большая группа симбионтных бактерий, принадлежащих к таксону более высокого ранга – представители нового типа Poribacteria, которые также участвуют в биосинтезе различных вторичных метаболитов [35]. Другие симбионты морских беспозвоночных идентифицированы как цианобактерии, фирмикуты и микроскопические грибы.

Цианобактерии известны своими экстремально активными пептидами, в том числе доластатинами, самыми мощными из всех выделенных из природных источников и синтезированных химиками токсичных для опухолевых клеток соединений. Они угнетают рост опухолевых клеток в пикомолярных концентрациях. Доластатины были впервые выделены из моллюска *Dolabella auricularia*, но их истинными продуцентами являются цианобактерии *Symploca hydnoides* и *Lyngbya majuscula*. Производное доластатина 10 (13), так называемый монометилауристатин E (14) (рис. 1), было выбрано в качестве активной субстанции для создания противоопухолевого лекарства Ведотина (Брентуксимаб или Адцетрис®), представителя нового поколения противоопухолевых лекарств направленного действия, представляющего собой моноклональные антитела, соединенные с монометилауристатином. Ведотин применяют с 2011 г. для лечения лимфом и других онкологических заболеваний [36, 37] (производитель – «BSP Pharmaceutical S.r.l.», Италия).

МОРСКИЕ АНТИБИОТИКИ С ПРОТИВОБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Однако наиболее многочисленные морские антибиотики относятся к метаболитам с сильным противобактериальным действием. Их поиск и открытие имеют большое значение, так как инфекционные болезни остаются одной из главных причин смерти людей. Среди них самые разные по химическому строению соединения: гетероциклические производные, хиноиды, продукты поликетидного происхождения, пептиды и др. Поиск таких веществ активно проводят десятки научных коллективов из многих стран мира. Лаборатория профессора Вильяма Феникала из Скриппсовского института океанографии (США), кроме салиноспорамидов, открыла еще несколько морских антибиотиков, в том числе антрацимицин (15) с сильным противобактериальным действием. Этот антибиотик, выделенный из актинобактерии *Streptomyces* sp. (штамм T676), собранной у острова Сент Джонс вблизи Сингапура, ингибирует бактерию *Bacillus anthracis* – возбудителя сибирской язвы, вызывающего смертельно опасное заболевание. *B. anthracis* уже была однажды использована террористами, рассылавшими своим жертвам письма с её спорами. Впервые антрацимицин был получен из другого морского стрептомицета (штамм CNH365), собранного из донных осадков у побережья Санта Барбары, Калифорния, США [38]. Химическое строение соединения 15 было установлено тщательным анализом его ЯМР-спектров и подтверждено

рентгеноструктурным анализом. Интересно, что в его структуре имеется необычная водородная связь, образованная двумя кетонными группами, причем одна из них находится в енольной форме (рис. 2). При обработке N-бромсукцинимидом в дихлорэтане антрацимицин образует дихлорпроизводное (16), которое также показывает высокую антибактериальную активность, в особенности против метициллин-резистентной *Escherichia coli* и некоторых других патогенных бактерий.

Биосинтез антрацимицина был изучен на генетическом уровне. Идентифицированный генный кластер «atc», ответственный за его биосинтез, состоял из 53 253 пар оснований. В него входит ген поликетид синтазы типа I и ацилтрансферазы, катализирующей образование малонил- и метилмалонил-коферментов А, которые участвуют в построении скелетной системы соединения 15. Экспрессия генного кластера в бактерии *Streptomyces coelicolor* приводила к продукции в этой бактерии антрацимицина. В биосинтезе участвуют 10 биосинтетических модулей, причем под их действием сначала образуется декалиновая циклическая система, а завершает биосинтез тиоэстераза, катализирующая замыкание макроцикла с образованием лактонной связи [39].

Новые противобактериальные агенты (17 и 18) (рис. 2) были найдены в морском изоляте *Streptomyces* sp. из цианобактериальной массы, собранной у берегов Пуэрто-Рико. Эти необычные бис-антрахиноны проявляли сильное ингибирующее действие в отношении штаммов ванкомицин-устойчивой *E. faecium*, метициллин- и тетрациклин-устойчивых штаммов *S. aureus*. Кроме них, были изучены их синтетические производные. Наиболее эффективный антибиотик (17) демонстрировал минимальную 50% бактерицидную концентрацию (MIC_{50}) 0,11; 0,23 и 0,90 мкМ против выше названных опасных бактериальных патогенов [40].

Из образцов донных осадков, собранных со дна бухты Миссон в Сан Диего (Калифорния), был выделен бактериальный штамм NPS12745. На основе последовательности нуклеотидов гена 16S РНК эта бактерия была идентифицирована как новый вид рода *Marinispora*. Экстракт этого микроорганизма ингибировал рост как грамположительных, так и грамотрицательных патогенных бактерий. Структуры полученных антибиотиков были установлены как новые бисиндолилпиррольные производные, названные линамицинами A–E (19–22) (рис. 2). Все они обладают сильным противобактериальным действием. Наиболее высокую активность показал линамицин B, причём он в концентрациях 2–4 мкг/мл ингибировал штаммы патогенных бактерий *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenzae* и *S. aureus* [41].

Гагеомакролактины, например гагеомакролактин (**23**) (рис. 2) из бактерий, выделенных из донных осадков на рифе Гагео в водах Республики Корея, проявляли высокую противобактериальную активность в отношении как грамположительных (*S. aureus*, *B. subtilis)*, так и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*) [42].

Пептидные антибиотики довольно часто находят в различных морских бактериях, например в актино- и цианобактериях. Скрининг 44 морских актиномицетов из семейства Micrococcaceae, выделенных из губок, собранных у побережья Флориды (США), привел к открытию новых продуцентов антибиотиков. Они были идентифицированы генетическими методами как представители родов *Kocuria* и *Micrococcus* и содержали гены нерибосомальной пептидсинтазы и поликетидсинтаз. Три полученных изолята продуцировали пептидный антибиотик кокурин (21) (рис. 2), новый член семейства тиазол-содержащих циклических пептидов [43].

Близкое по структуре соединение, названное антибиотиком PM181104 (рис. 2), было получено индийскими химиками при культивировании принадлежащей к этому же роду бактерии из губки *Spirastrella inconstans* var. *digitate*, собранной в бухте Палк, Индия. Этот антибиотик ингибировал различные патогенные бактерии, в том числе антибиотико-устойчивые штаммы, в концентрациях приблизительно 1 нМ. В опытах *in vivo* он на 100% защищал животных от сепсиса, вызванного метициллин-устойчивой *S. aureus* и ванкомицин-устойчивыми энтерококками, при введении мышам в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно [44].

Число перспективных антибиотиков из морских организмов растет год от года, что привлекает внимание все новых и новых научных групп по всему миру.

АНТИФУНГАЛЬНЫЕ МОРСКИЕ АНТИБИОТИКИ

Болезнетворные грибы, вызывающие тяжелые микозы, остаются одной из главных угроз для раковых больных с ослабленной в результате химиотерапии иммунной системой, а также для пациентов со СПИДом и другими болезнями, вызывающими иммунодефицитные состояния. Такие больные часто инфицируются оппортунистическими грибами, например представителями родов *Candida*, *Aspergillus* и *Crypto-*

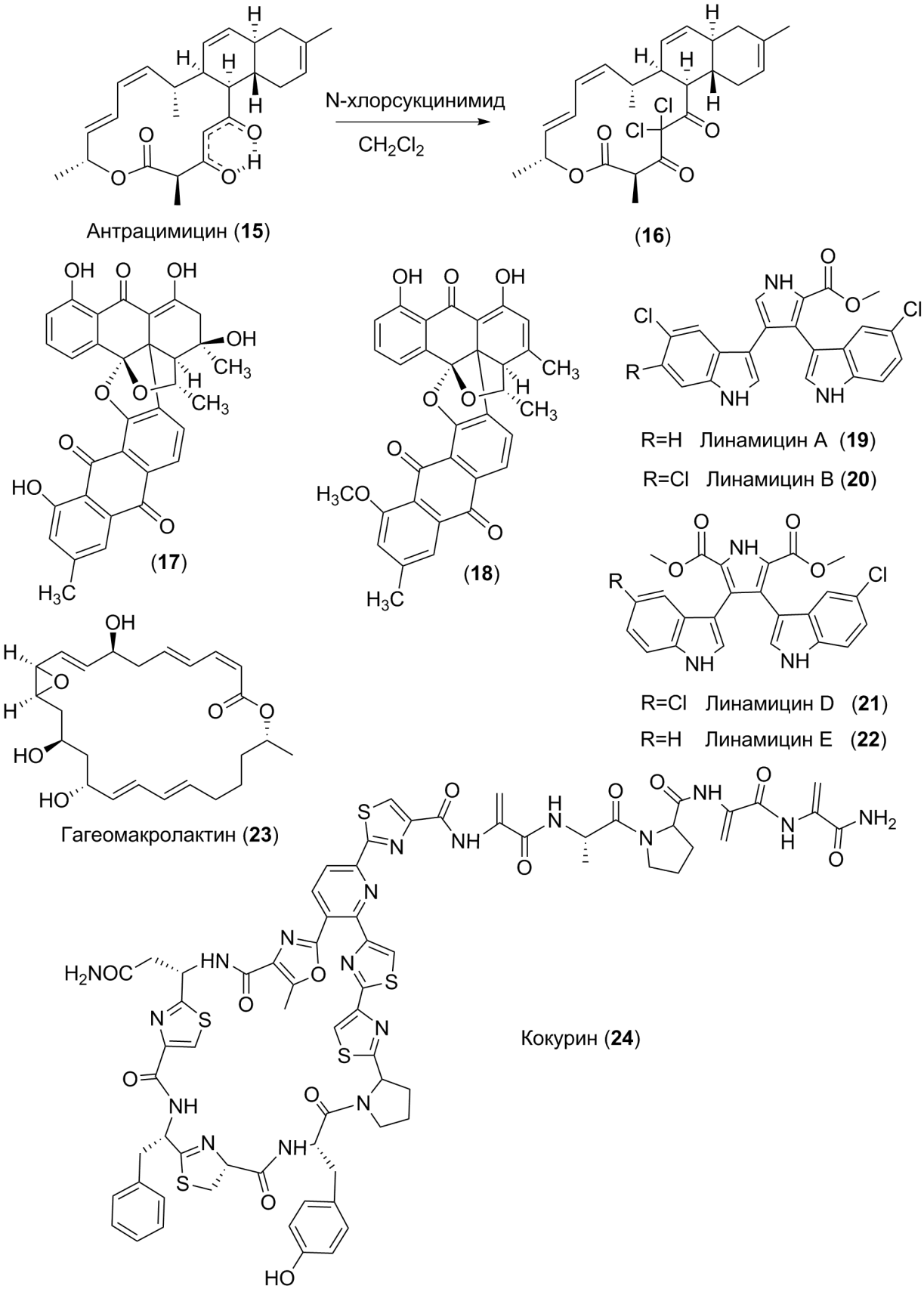


Рис. 2. Некоторые противобактериальные метаболиты морских бактерий

coccus, с тяжелыми последствиями вплоть до летальных исходов. Около 500 тыс. человек ежегодно погибают от таких инфекций, а ущерб составляет около 12 млрд долларов. Поиск антифунгальных природных соединений и разработка на этой основе лекарств – актуальная задача современной науки.

Некоторые метаболиты морских бактерий, в особенности актиномицетов, в последние годы стали известны своими антифунгальными свойствами. Например, саадамицин (25) (рис. 3), поликетидный антибиотик из актинобактерии *Streptomyces* sp. (новый вид этого рода), выделенной из собранной у берегов Египта губки *Aplysina fistularis*, обладает мощным антифунгальным действием на *Candida albicans*, *Aspergillus* и *Cryptococcus* с минимальной ингибирующей концентрацией (MIC) 1–5,2 мкг/мл и минимальной фунгицидной концентрацией (MFC) 2–10 мкг/мл [45]. Интересно, что открывшие этот новый микробиальный источник ученые смогли увеличить продукцию антибиотика в 2,26 раза после обработки его продуцента ультрафиолетовыми лучами, а полученный мутантный штамм Ah22 использовали затем для выделения и установления строения самого антибиотика. По своему строению соединение 25 не отличается большой сложностью. Оно представляет собой продукт поликетидного биосинтеза, имеющий α-пироновый цикл, и является производным 5-гидрокси-2-оксо-2H-пирана.

Феноксазиновое производное, хондрананимицин A (26) (рис. 3), и родственные ему соединения были выделены из актинобактерии *Actinomadura* sp. из донных осадков бухты Гуанджоу (КНР). Соединение 29 ингибирует ряд грибов, в том числе *Mucor miehei*, ферменты которого используют при производстве сыра [46].

Ряд актиномицетов, в том числе штамм BM-17, были выделены из образца донных осадков,

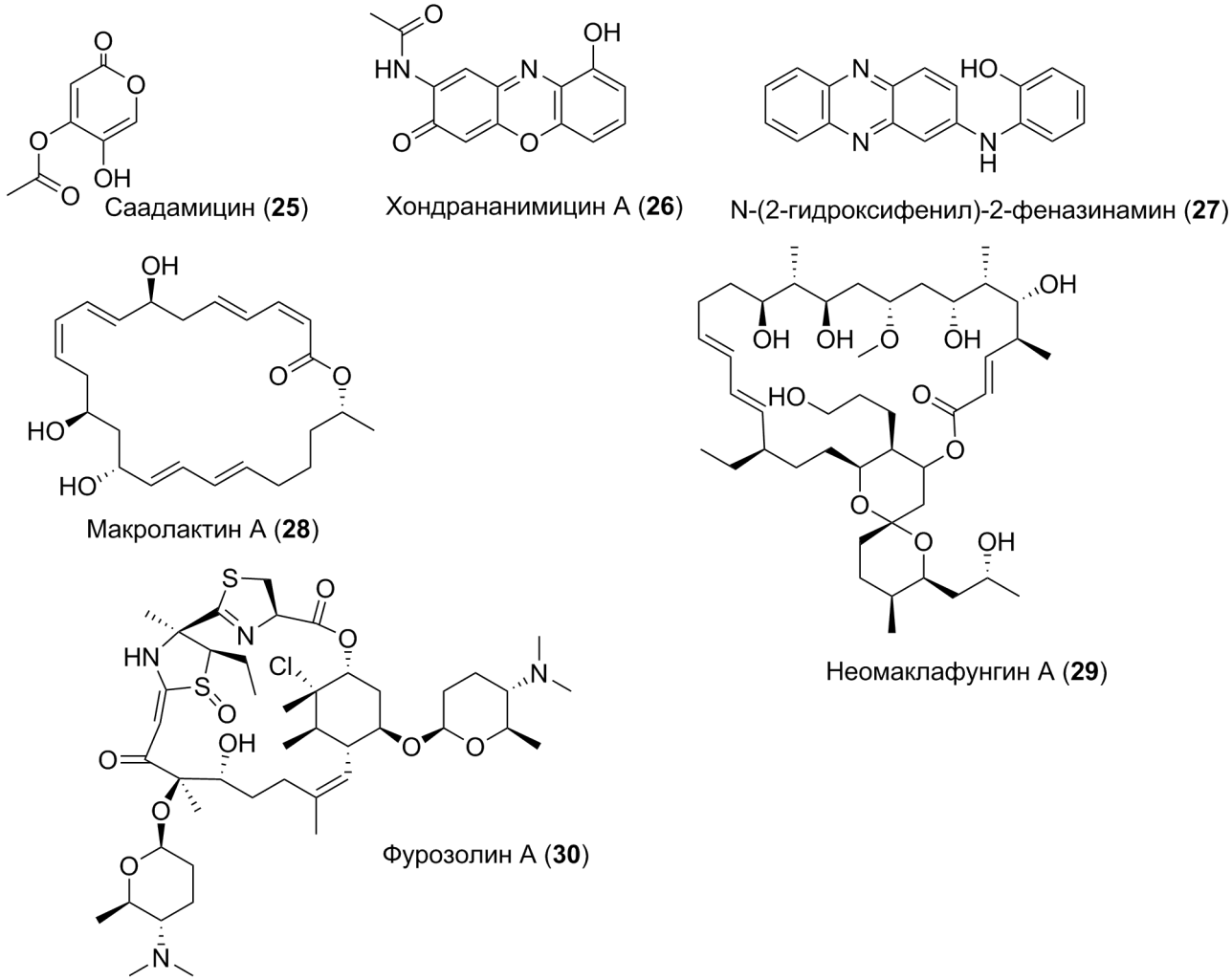


Рис. 3. Некоторые антифунгальные метаболиты из морских микроорганизмов

собранных в Арктическом океане. Этот штамм был идентифицирован как *Nocardia dassonvillei*. Новый вторичный метаболит, N-(2-гидроксифенил)-2-феназинамин (**27**) (рис. 3) вместе с ранее известными феназиновыми антибиотиками был получен при культивировании этого штамма. Это соединение показало значительную антифунгальную активность против *C. albicans* с MIC_{50} 64 мкг/мл и цитотоксическими свойствами в отношении ряда линий опухолевых клеток [47].

Другие морские макролиды также часто показывают антифунгальные свойства. Например, макролактин A (28) (рис. 3) и близкие к нему макролактины, выделенные из бактерии *B. subtilis*, собранной в районе уже упоминавшегося рифа Гагео, проявляют сильное антифунгальное действие против *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *Botrytis cinerea* и *Colletotrichum acutum*. Минимальные ингибирующие концентрации были низкими, всего 0,04–0,3 мкМ [48]. Некоторые родственные им макролиды также проявляют сильное антифунгальное действие [49].

Неомаклафунгин A (29) (рис. 3) из бактерии *Actinoalloteichus* sp. NPS702, выделенной из образца донного осадка бухты Уса (Япония) [50], проявляет значительную антифунгальную активность против *Trichophyton mentagraphites* (MIC 1–3 мкг/мл). После синтеза его строение было пересмотрено [51].

Как и бактерии, патогенные грибы быстро вырабатывают механизмы лекарственной устойчивости и образуют флуконазол- и амфотерицин-устойчивые штаммы, особенно это характерно для видов, относящихся к роду *Candida*. Кандидозами болеют около 400 тыс. человек ежегодно. При этом грибы применяют различные биохимические механизмы, чтобы избежать летального действия фунгицидов: например, они с помощью специальных транспортных систем выбрасывают лекарства из клеток. В последние годы найдены морские метаболиты, активные против таких штаммов. Так, с использованием жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии был открыт поликетидный метаболит – фурозолин из бактерии *Actinimadura* sp. Эта бактерия была высеяна из асцидии *Ecteinascidia turbinata*. Фурозолин A (30) (рис. 4) ингибирует патогенные грибы в дозе 16 мкг/мл, а также излечивает мышей с экспериментальным рассеянным кандидозом [52].

Интересно, что некоторые морские полярные стероиды, например полярные стероиды из губки *Dysidea arenaria*, усиливают активность противогрибковых медицинских препаратов и отменяют флуконазольную резистентность патогенных грибов. При этом активность противогрибковых лекарств может усиливаться в 35 раз [53].

АНТИБИОТИКИ С ПРОТИВОВИРУСНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Немного противовирусных метаболитов найдены среди метаболитов морских актинобактерий. Возможно, это связано с менее интенсивным поиском таких веществ по сравнению с противоопухолевыми и антифунгальными морскими природными соединениями. Бензастатин C (31) (рис. 4) был получен из морской бактерии *Streptomyces nitrosporeus*. Он показывает дозозависимое ингибирующее действие с EC_{50} 1,92 и 0,53 мкг/мл против вирусов герпеса HSV-1 и HSV-2. Таким образом, он был активнее в этих тестах, чем Ara C, известный лекарственный препарат, также созданный на основе морских природных соединений и ставший родоначальником нуклеозидных противовирусных препаратов. При этом цитотоксические свойства 31 были невысокими. Соединение 31 проявляет также противовирусное действие в отношении вируса везикулярного стоматита. Показано, что присутствие хлора необходимо для проявления этим лидерным соединением противовирусного эффекта [54].

Антимицин 1A (32) (рис. 4) [55] был выделен из нового вида, *Streptomyces kaviengensis*, полученного из образца донных осадков, собранных у берегов острова Новая Ирландия (Папуа – Новая Гвинея). Полученное соединение показывает экстремально высокое противовирусное действие (IC_{50} 4 нМ) против вируса энцефалита лошадей. Механизм его действия связан со способностью ингибировать электрон-транспортную сеть в митохондриях и подавлять *de novo* биосинтеза пиримидиновых производных. Введение препарата *in vivo* увеличивает выживание животных, зараженных этим вирусом. Антимицин ингибирует и другие РНК-вирусы.

Бутенолидные производные (33–37) (рис. 4) из экстрактов *Streptomyces* sp. активны против аденовирусов. Известно, что аденовирусные инфекции связаны с высокой смертностью пациентов с иммунодефицитными состояниями. Считают, что эффективные медицинские средства для борьбы с такими инфекциями отсутствуют. Актинобактерия, собранная в одном из фиордов у берегов Норвегии, продуцировала простые вещества, бутенолиды, в виде смесей родственных метаболитов с противоаденовирусными свойствами. Наиболее активное вещество имеет эффективную концентрацию EC_{50} 91 мкМ и отсутствие заметной цитотоксичности для клеток человека. Эти вещества представля-

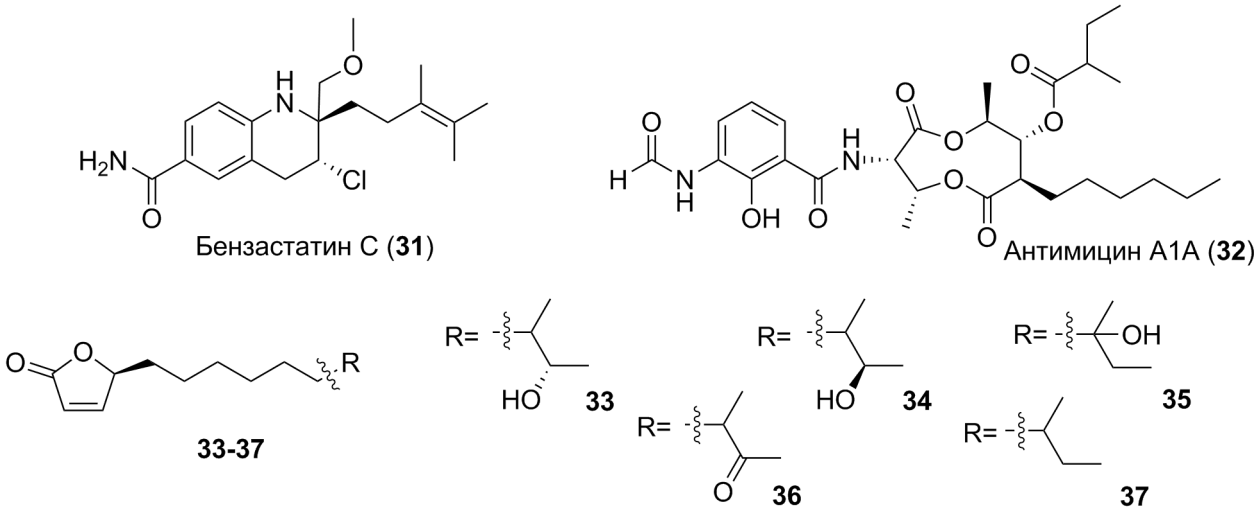


Рис. 4. Примеры морских антибиотиков с противовирусными свойствами

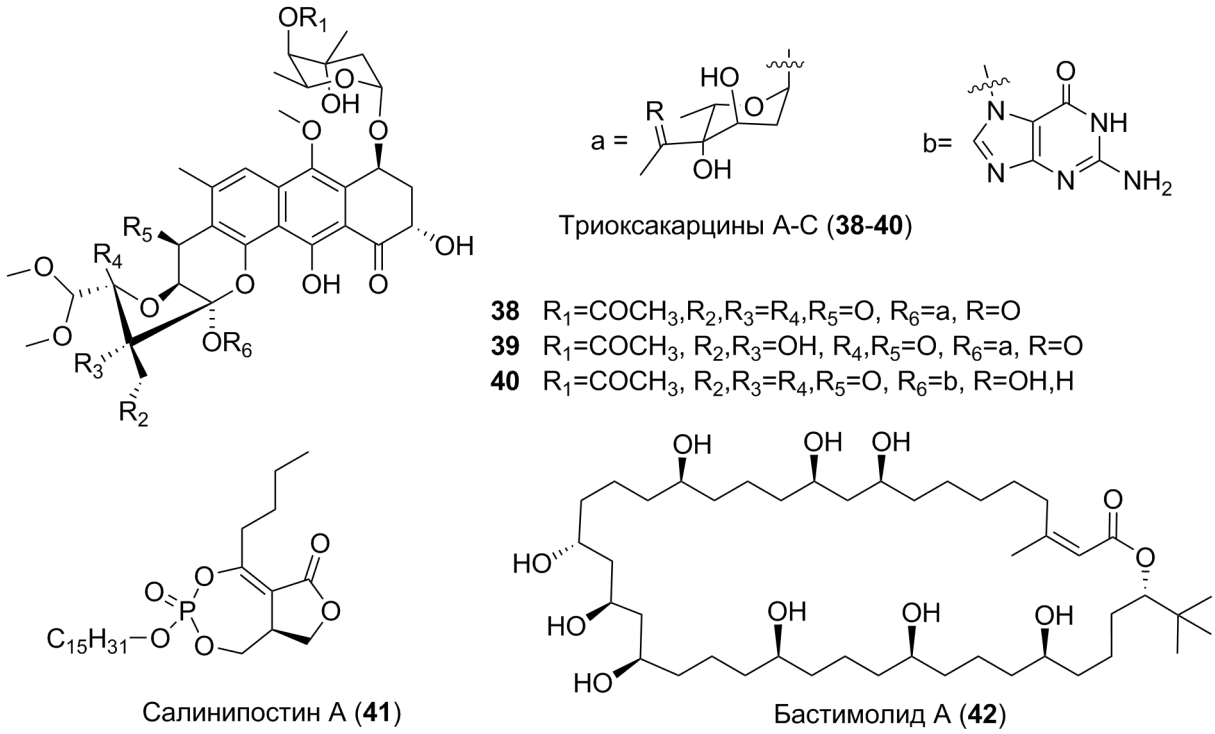


Рис. 5. Примеры новых антималярийных соединений из морских бактерий

ют интерес в качестве модельных соединений для создания соответствующих лекарств [56].

ПРОТИВОПАРАЗИТАРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ

На протяжении многих столетий малярия ежегодно уносила тысячи жизней, пока не были созданы антималярийные лекарственные препараты первого и второго поколений. Хинин, хлорохин и другие лекарственные средства защитили многие млн людей, но, к сожалению, позже появились резистентные к таким лекарствам формы малярии. Как известно, эту болезнь вызывает простейшее – малярийный плазмодий (*Plasmodium falciparum*), переносимый к людям при укусе комаров. В Африке малярия – самая распространенная болезнь, все больше жертв она собирает в Южной Америке и Юго-Восточ-

ной Азии. Поиск новых антималярийных соединений и разработка соответствующих лекарств с каждым годом становятся все более востребованными. К недавним успехам можно отнести результаты исследований, отмеченные Нобелевской премией по медицине за создание на основе природных соединений нового антималярийного препарата артемизинина и противопаразитарного препарата авермектина.

К морским антималярийным соединениям относят триоксакарцины (38–40) (рис. 5), продуцируемые *Streptomyces ochraceus* и *Streptomyces bottropensis.* Все триоксакарцины проявляют антибактериальные, противоопухолевые, а некоторые (в особенности 38) и противомалярийные свойства [57].

Салинипостины A–K (были получены из микробиального штамма *Salinispora* sp., собранного со дна бухты Кеавекахека) ингибируют хлорохин-резистентные W2 штаммы *P. falciparum* с EC_{50} 50 нМ–50 мкМ. Из них салинипостин A (41) проявляет самый сильный эффект (EC_{50} 50 нМ), он тормозит одну из ростовых стадий плазмодия. Ожидают, что к нему, как не затрагивающему гем препарату, труднее будет вырабатываться резистентность [58].

Новый полигидроксимакролид, бастимолид A (42) (рис. 5), был выделен из тропической цианобактерии *Okeania hirsuta*. Он ингибировал четыре лекарственно-устойчивых штамма малярийного плазмодия в наномолярных концентрациях и был менее токсичен и для нормальных, и для опухолевых клеток [59]. Высокая антималярийная активность была найдена и для упомянутого выше салиноспорамида A, который изучается в клинике как противоопухолевый препарат. Предполагают, что он действует на 20S протеасому паразита. Введение салиноспорамида A в дозе 130 мкг/кг защищает мышей от малярийной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морские природные соединения привлекают в последние годы все больше внимания. В нашей стране их изучением занимаются не так уж много научных групп, причем они сосредоточены только в двух городах – в Москве и Владивостоке. Неожиданно высокое структурное разнообразие метаболитов из морских изолятов бактерий и их перспективное биологическое действие делает вполне реальным разработку на их основе новых медицинских препаратов, а несколько таких соединений уже стали основой новых лекарств или проходят в настоящее время доклинические или клинические исследования. Структурная новизна и довольно сложное химическое строение многих из них значительно затрудняют установление строения таких веществ, причем в ряде случаев эту задачу удается решить только с применением рентгеноструктурного анализа. В отличие от США и Японии, в России недостаточно развит направленный асимметрический синтез природных соединений, чему следует уделить дополнительное внимание. Это затрудняет получение целевых веществ в необходимых для их глубокого изучения количествах. Проблему наработки целевых веществ решают в основном одним из двух способов: получением суперпродуцентов методами селекции и мутагенеза или переносом соответствующих генных кластеров в легко культивируемые виды бактерий.

Несмотря на существующие трудности и проблемы, мы в России имеем ряд преимуществ при работе в этой области. К ним относятся: 1) большая береговая линия страны и широкие возможности сбора нужного биологического материала и 2) существование во Владивостоке единственной в стране живой коллекции морских бактерий и грибов, имеющей около 4 тыс. аксенических штаммов, собранных в различных географических зонах Мирового океана.

Природа создала в Мировом океане уникальные структурные богатства, изучение и использование которых является важной задачей фундаментальной и прикладной науки.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Договора № 9188107-ОК-20 на выполнение научно-исследовательской работы для нужд ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России в 2020 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis.
2. Pendleton, J. N, Gorman, S. P., and Gilmore, B. F. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens, *Exp. Rev. Anti Infect. Ther.*, **11**, 297-308, doi: 10.1586/eri.13.12.
3. URL: https://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.
4. Schinke, C., Martins, T., Queiroz, S. C. N., Melo, I. S., and Reyes, F. G. R. (2017) Antibacterial compounds from

marine bacteria, 2010–2015, *J. Nat. Prod.*, **80**, 1215-1228, doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00235.
5. Newman, D. J., and Cragg, D. J. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J. Nat. Prod.*, **70**, 461-477, doi: 10.1021/np068054v.
6. Jensen, P. R., and Fenical, W. (1996) Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products, *J. Ind. Microbiology*, **17**, 346-351, doi: 10.1007/BF01574765.
7. Jensen, P. R., and Fenical, W. (1994) Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives, *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 559-584, doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.003015.
8. Davidson, B. (1995) New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 284-291, doi: 10.1016/0958-1669(95)80049-2.
9. Pietra, F. (1997) Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects, *Nat. Prod. Rep.*, **14**, 453-464, doi: 10.1039/NP9971400453.
10. Андрюков Б. Г., Михайлов В. В., Беседнова Н. Н., Запорожец Т. С., Бынина Т. С., Матосова Е. В. (2018) Бактериоцианогенный потенциал морских микроорганизмов, *Биология моря*, **44**, 371-380, doi: 10.1134/S1063074018060020.
11. Eom, S. H., Kim, Y. M., and Kim, S. K. (2013) Marine bacteria: potential sources for compounds to overcome antibiotic resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 4763-4773, doi: 10.1007/s00253-013-4905-y.
12. Rahman, H., Austin, B., Mitchell, W. J., Morris, P S., Jamieson, D. J., Adams, D. R., Spragg, A. M., and Schweitzer, M. (2010) Novel anti-infective compounds from marine bacteria, *Mar. Drugs*, **8**, 498-518, doi: 10.3390/md8030498.
13. Михайлов В. В. (2005) Морская микробиология в ТИБОХ ДВО РАН, *Вестник ДВО РАН*, **2**, 145-152.
14. Romanenko, L. A., Uchino, M., Frolova, G. M., Tanaka, N., Kalinovskaya, N. I., Latyshev, N., and Mikhailov, V. V. (2007) *Sphingomonas molluscorum* sp. nov., a novel marine isolate with antimicrobial activity, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 358-363, doi: 10.1099/ijs.0.64441-0.
15. Manivasagan, P., Venkatesan, S., Sivakumar, S., and Kim, S. K. (2014) Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria, *Microbiol. Res.*, **169**, 262-278, doi: 10.1016/j.micres.2013.07.014.
16. Ul Hassan, S. S., Anjum, K., Abbas, S. Q., Akhter, N., Shagufta, B. I., Shah, S. A. A., and Tasneem, U. (2017) Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **49**, 34-47, doi: 10.1016/j.etap.2016.11.015.
17. Weyland, H. (1969) Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments, *Nature*, **223**, 858, doi: 10.1038/223858a0.
18. Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., and LokaBharathi, P. A. (2010) Marine drugs from sponge-microbe association – a review, *Mar. Drugs*, **8**, 1417-1468, doi: 10.3390/md8041417.
19. Reddy, T. B. K., Thomas, A. D., Stamatis, D., Bertsch, J., Isbandi, M., Jansson, J., Mallajosyula, J., Pagani, I., Lobos, E. A., and Kyrpides, N. C. (2014) The genome online database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1099-1106, doi: 10.1093/nar/gku950.
20. Khan, S. T., Tamura, T., Takagi, M., and Shin-ya, K. (2010) *Streptomyces tateyamensis* sp. nov., *Streptomyces marinus* sp. nov. and *Streptomyces haliclonae* sp. nov., isolated from the marine sponge *Haliclona* sp., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**, 2775-2779, doi: 10.1099/ijs.0.019869-0.
21. Tian, X. P., Tang, S. K., Dong, J. D., Zhang, Y. Q., Xu, L. H., Zhang, S., and Li, W. J. (2009) *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 948-952, doi: 10.1099/ijs.0.005231-0.
22. Schumann, P., Cui, X., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R. M., Xu, L., and Jiang, C. (2004) *Jonesia quinghaiensis* sp. nov., a new member of the suborder Micrococcineae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2181-2184, doi: 10.1099/ijs.0.63223-0.
23. Han, S. K., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Kim, S. B., and Bae, K. S. (2003) *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 2061-2066, doi: 10.1099/ijs.0.02627-0.
24. Tian, X. P., Zhi, X. Y., Qiu, Y. Q., Zhang, Y. Q., Tang, S. K., Xu, L. H., Zhang, S., and Li, W. J. (2009) *Sciscionella marina* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 222-228, doi: 10.1099/ijs.0.001982-0.
25. Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T., and Goodfellow, M. (2005) *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov. obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1759-1766, doi: 10.1099/ijs.0.63625-0.
26. Jensen, P. R., Moore, B. S., and Fenical, W. (2015) The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery, *Nat. Prod. Rep.*, **32**, 738-751, doi: 10.1039/c4np00167b.
27. Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. (2003) Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 355-357, doi: 10.1002/anie.200390115.
28. Williams, P. G., Buchanan, G. O., Feling, R. H., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. (2005) New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, *J. Org. Chem.*, **70**, 6196-6203, doi: 10.1021/jo050511+.
29. Macherla, V. R., Mitchell, S. S., Manam, R. R., Reed, K. A., Chao, T. H., et al. (2005) Structure-activity relationship studies of salinosporamide A (NPI-0052), a novel marine derived proteasome inhibitor, *J. Med. Chem.*, **48**, 3684-3687, doi: 10.1021/jm048995+.
30. Miller, E. D., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. (2007) Piperazimycins: cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*, *J. Org. Chem.*, **72**, 323-330, doi: 10.1021/jo061064g.
31. Kalinovskaya, N. I., Romanenko, L. A., Kalinovsky, A. I., Ermakova, S. P., Dmitrenok, P. S., and Afiyatullov, S. S. (2017) The antitumor antibiotics complex of aureolic acids from the marine sediment-associated strain of *Streptomyces* sp. KMM 9048, *Nat. Prod. Comm.*, **12**, 571-577.
32. Rinehart, K. L. (1999) Antitumor compounds from tunicates, *Med. Res. Revs.*, **20**, 1-27, doi: 10.1002/(SICI)1098-1128(200001)20:1<1::AID-MED1>3.0.CO;2-A.
33. Rath, C. M., Janto, B., Earl, J., Ahmed, A., Hu, F. Z., et al. (2011) Meta-omic characterization of the marine inver-

tebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743, *ACS Chem. Biol.*, **6**, 1244-1256, doi: 10.1021/cb200244t.
34. Blockley, A., Elliott, D. R., Roberts, A. P., and Sweet, M. (2017) Symbiotic microbes from marine invertebrates: driving a new era of natural product drug discovery, *Diversity*, **9**, 49, doi: 10.3390/d9040049.
35. Bibi, F., Faheem, M., Azhar, E. I., Yasir, M., Alvi, S. A., Kamal, M. A., Ullah, I., and Naseer, M. I. (2017) Bacteria from marine sponges: a source of new drugs, *Curr. Drug Metab.*, **18**, 11-18, doi: 10.2174/1389200217666161013090610.
36. Francisco, J. A., Cerveny, C. G., Meyer, D. L., Mixan, B. J., Klussman, K., et al. (2003) cAC10-vcMMAE, an anti-CD30–monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity, *Blood*, **102**, 1458-1465, doi: 10.1182/blood-2003-01-0039.
37. Zhou, Q., and Kim, J. (2015) Advances in the development of site-specific antibody-drug conjugation, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **15**, 828-836, doi: 10.2174/1871520615666150302125448.
38. Jang, K. H., Nam, S. J., Locke, J. B., Kauffman, C. A., Beatty, D. S., Paul, L. A., and Fenical, W. (2013) Anthracimycin, a potent anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 7822-7824, doi: 10.1002/anie.201302749.
39. Alt, S., and Wilkinson, B. (2015) Biosynthesis of the novel macrolide antibiotic anthracimycin, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2468-2479, doi: 10.1021/acschembio.5b00525.
40. Socha, A. M., LaPlante, K. L., and Rowley, D. C. (2006) New bisanthraquinone antibiotics and semi-synthetic derivatives with potent activity against clinical *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 8446-8454, doi: 10.1016/j.bmc.2006.08.038.
41. McArthur, K. A., Mitchell, S. S., Tsueng, G., Rheingold, A., White, D. J., Grodberg, J., Lam, K. S, and Potts, B. C. M. (2008) Lynamicins A-E, chlorinated bisindole pyrrole antibiotics from a novel marine actinomycete, *J. Nat. Prod.*, **71**, 1732-1737, doi: 10.1021/np800286d.
42. Tareq, F. S., Kim, J. H., Lee, M. A., Lee, H. S., Lee, J. S., Lee, Y. J., and Shin, H. J. (2013) Antimicrobial gageomacrolactins characterized from the fermentation of the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis* under optimum growth conditions, *J. Agricult. Food Chem.*, **61**, 3428-3434, doi: 10.1021/jf4009229.
43. Palomo, S., González, I., de la Cruz, M., Martín, J., Tormo, J. R., Anderson, M., Hill, R. T., Vicente, F., Reyes, F., and Genilloud, O. (2013) Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin, *Mar. Drugs*, **11**, 1071-1086, doi: 10.3390/md11041071.
44. Mahajan, G., Thomas, B., Parab, R., Patel, Z. E, Kuldharan, S., et al. (2013) *In vitro* and *in vivo* activities of antibiotic PM181104, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 5315-5319, doi: 10.1128/AAC.01059-13.
45. El-Gendy, M. M. A., and El-Bondkly, A. M. A. (2010) Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48, *J. Indust. Microbiol. Biotech.*, 37, 831-841, doi: 10.1007/s10295-010-0729-2.
46. Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H., and Laatsch, H. (2003) Chandrananimycins A approximately C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions, *J. Antibiot.*, **56**, 622-629, doi: 10.7164/antibiotics.56.622.
47. Gao, X., Lu, Y., Xing, Y., Ma, Y., Lu, J., Bao, W., Wang, Y., and Xi, T. (2012) A novel anticancer and antifungus phenazine derivative from a marine actinomycete BM-17, *Microbial. Res.*, **167**, 616-622, doi: 10.1016/j.micres.2012.02.008.
48. Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., Nishima, M., and Sano, H. (2001) Novel macrolactins as antibiotic lactones from a marine bacterium, *J. Antibiot.*, **54**, 333-339, doi: 10.7164/antibiotics.54.333.
49. Karpinsky, T. M. (2019) Marine macrolides with antibacterial and/or antifungal; activity, *Mar. Drugs*, **17**, 241, doi: 10.3390/md17040241.
50. Sato, S., Iwata, F., Yamada, S., and Katayama, M. (2012) Neomaclafungins A–I: oligomycin-class macrolides from a marine-derived actinomycete, *J. Nat. Prod.*, **75**, 1974-1982, doi: 10.1021/np300719g.
51. Zhu, S., and Wu, Y. (2017) Synthesis and configuration of neomaclafungin A, *Chem. Asian J.*, **12**, 2211-2215, doi: 10.1002/asia.201700950.
52. Wyche, T. P., Piotrowsky, J. S., Hou, Y., Braun, D, Deshpande, R., et al. (2014) Furozoline A: marine-derived polyketide with antifungal *in vivo* efficacy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 1-5, doi: 10.1002/anie.201405990.
53. Abdelmohsen, U. R., Balasubramanian, S., Oelschlaeger, T. A., Grkovic, T., Pham, N. B., Quinn, R. J., and Hentschel, U. (2017) Potential of marine natural products against drug-resistant, viral, and parasitic infections, *Lancet Infect. Dis.*, **17**, e30-e41, doi: 10.1016/S1473-3099(16)30323-1.
54. Lee, J. G., Yoo, I. D., and Kim, W. G. (2007) Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*, *Biol. Pharm Bull.*, **30**, 795-797, doi: 10.1248/bpb.30.795.
55. Raveh, A., Delecta, P. C., Dobry, C. J., Peng, W., Schultz, P. J., Blakely, P. K., and Miller, D. J. (2013) Discovery of potent broad spectrum antivirals derived from marine actinobacteria, *PLOS One*, **8**, e 82318, doi: 10.1371/journal.pone.0082318.
56. Strand, M., Carlsson, M., Uvell, H., Islam, K., Edlung, K., Cullman, I., et al. (2014) Isolation and characterization of anti-adenoviral secondary metabolites from marine actinobacteria, *Mar. Drugs*, **12**, 799-821, doi: 10.3390/md12020799.
57. Maskey, R. P., Helmke, E., Kayser, O., Fiebig, H. H., Maier, A., Busche, A., and Laatsch, H. (2004) Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine *Streptomycete* and their absolute stereochemistry, *J. Antibiot.*, **57**, 771-779, doi: 10.7164/antibiotics.57.771.
58. Schulze, C. J., Navarro, G., Ebert, D., DeRisi, J., and Lenington, R. G. (2015) Salinipostins A-K, long-chain bicyclic phosphotriesters as a potent and selective antimalarial chemotype, *J. Org. Chem.*, **80**, 1312-1320, doi: 10.1021/jo5024409.
59. Shao, C. L., Lenington, R. G., Balunas, M. J., Centeno, A., Boudreau, P., et al. (2015) Bastimolide A, a potent antimalarial polyhydroxy macrolide from a marine cyanobacterium *Okeania hirsuta*, *J. Org. Chem.*, **80**, 7849-7855, doi: 10.1021/acs.joc.5b01264.

ANTIBIOTICS FROM MARINE BACTERIA

Review

V. A. Stonik*, T. N. Makarieva, and L. K. Shubina

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Science, 690022 Vladivostok, Russia; E-mail: stonik@piboc.dvo.ru

Received July 3, 2020
Revised August 5, 2020
Accepted August 5, 2020

This review discusses main directions and results of the studies on antibiotics produced by bacteria living in the marine environment. In recent years many obligate marine species and strains were studied, diverse metabolites were isolated, and their chemical structures were elucidated. Among them here were natural compounds toxic against tumor cells, pathogenic bacteria, viruses, and malaria plasmodial species; these compounds often had no analogues among the natural products of terrestrial origin. Some isolated compounds form a basis of active ingredients in medicinal preparations used in clinic practice, while others are under different stages of preclinical or clinical studies. Much attention has been paid in recent years to producers of marine-derived antibiotics isolated from the deep-sea habitats, from the surface of marine invertebrates and algae, as well as from symbiotic microorganisms.

Keywords: marine bacteria, antibiotics, cytotoxic effect, antibacterial effect, antifungal effect, antiviral effect, antiparasitic effect

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1615 – 1632

УДК 577.29

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В БОРЬБЕ С ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Обзор

© 2020 И.Г. Шемякин[1], В.В. Фирстова[1]*, Н.К. Фурсова[1], И.В. Абаев[1], С.Ю. Филиппович[2], С.Г. Игнатов[1], И.А. Дятлов[1]

[1] *Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279 Оболенск, Московская обл., Россия; электронная почта: firstova@obolensk.org*

[2] *Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 12.07.2020
После доработки 14.09.2020
Принята к публикации 14.09.2020

В обзоре приводятся разнообразные подходы в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний. Новым инструментом достижения элиминации только специфичных видов бактерий с сохранением остальной части микробиоты могут служить видоспецифические программируемые RNA-содержащие антибиотики, которые открывают возможность создания нового поколения персонализированных терапевтических препаратов, основанных на редактировании микробиома. Рассмотрены возможности геномного редактирования на основе CRISPR-Cas патогенных бактерий. Расширяющиеся знания о молекулярных механизмах врожденных иммунных реакций активно пытаются использовать для индукции противомикробного иммунитета. Однако к очевидным рискам применения адъювантов, направленных на активацию компонентов иммунной системы хозяина, относятся возможное развитие аутоиммунного состояния с последующим повреждением органов. Поэтому необходимо иметь чёткое представление о механизмах действия специфических соединений и сигнальных молекул, используемых в качестве компонентов гибридного антибиотика. Рассмотрены эффективные противомикробные препараты – эндолизины бактериофагов для элиминации устойчивых к антибиотикам бактерий, метаболически неактивных персисторов и биоплёнок. Представлены новые подходы в материаловедении при конструкции имплантатов с антибактериальными свойствами для преодоления проблемы постоперационных инфекций. Разнообразные наномодификации поверхности имплантатов призваны уменьшить бактериальную обсемененность поверхности. Описаны бактерицидная и фунгицидная активности наномодификаций поверхности серебром, гибридных наноматериалов на основе бор-нитрида, нановолокон и наногальванических процессов на поверхности с оценкой иммуномодулирующей активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: RNA-содержащие антибиотики, CRISPR-Cas система бактерий, гибридные антибиотики, эндолизины, наноповерхности.

DOI: 10.31857/S0320972520110081

ВВЕДЕНИЕ

Сразу же после открытия пенициллина в 1929 г. было выявлено большое число новых бактерицидных соединений, и к середине 60-х гг. было охарактеризовано более 20 видов антибиотиков. Появление устойчивых к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней, в том числе пан-резистентных изолятов (нечувствительных уже ко всем антибиотикам из всех функциональных классов), поднимает вопросы дальнейшего исследования возбудителей и новых подходов борьбы с патогенами (антибактериальные препараты на основе RNA, гибридные антибиотики, эндолизины бактериофагов и новые наноматериалы).

Принятые сокращения: sRNA – малые некодирующие RNA; ASOs – антисмысловые олигонуклеотиды; QS – Quorum Sensing; TLR – Toll-подобные рецепторы; NOD – Nod-подобные рецепторы; ПГГ – пептидогликангидролазы; АФК – активные формы кислорода; BN – бор-нитридные наноструктуры; PMO – фосфородиамидатные морфолино олигомеры, *phosphorodiamidate morpholino oligomer*; PNA – пептидо-нуклеиновые кислоты, *peptide nucleic acid*; AcpP – белок биосинтеза незаменимых жирных кислот; CPPs – проникающие внутрь клетки пептиды, *cell-penetrating peptide*.

* Адресат для корреспонденции.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ RNA

Антибиотики широкого спектра действия, которые действуют на большой круг возбудителей бактериальных инфекций, грамотрицательных и грамположительных, спасли миллионы человеческих жизней и остаются одним из самых важных классов лекарств в современной медицине. Однако в некоторых ситуациях предпочтительно использование антибиотиков узкого спектра действия – при необходимости уничтожать отдельные виды бактерий в сложном сообществе микробиома человека, что невозможно с помощью антибиотиков широкого спектра действия. К числу уже используемых в настоящее время препаратов узкого спектра относятся колицины [1], недавно разработанные антагонисты фимбрий некоторых патогенных штаммов кишечной палочки [2], видоспецифичные антитела [3] и бактериофаги [4].

Новым инструментом достижения элиминации только специфичных видов бактерий с сохранением остальной части микробиоты могут служить видоспецифические программируемые RNA-содержащие антибиотики, которые открывают возможность создания нового поколения персонализированных терапевтических препаратов, основанных на редактировании микробиома. Они могут быть синтезированы химически и запрограммированы на поражение конкретных видов бактерий. В этом смысле наиболее перспективными направлениями на настоящий момент представляется использование малых некодирующих RNA (sRNA), играющих важную роль в регуляции трансляции у бактерий, а также систем CRISPR-Cas, играющих роль иммунной системы у бактерий и обеспечивающих защиту от мобильных генетических элементов.

Малые некодирующие RNA в качестве антибактериальных препаратов. Разработка антимикробных препаратов на основе RNA в форме коротких антисмысловых олигонуклеотидов (ASOs), которые будут нацелены на ингибирование существенных генов бактерий на уровне RNA, представляет большой научный и практический интерес. Класс регуляторных молекул RNA не является чем-то чужеродным для бактериальных клеток. Малые некодирующие RNA играют существенную роль в регуляции синтеза широкого спектра белков, в том числе факторов вирулентности, кворума, метаболизма углерода, аминокислот и железа. Этот механизм подробно изучен на примере подавления инициации трансляции путем деградации матричных RNA, вызываемой присоединением к ним Hfq-ассоциированных sRNA у *Escherichia coli* и *Salmonella* [5]. Мультимерный белок Hfq – это плейотропный регулятор экспрессии бактериальных генов, играющий роль RNA-шаперона, обеспечивая взаимодействие между sRNA и её мишенью на мRNA. Интересно, что эндогенные бактериальные sRNAs имеют достаточно большой размер (~50–400 нуклеотидов), но их «коровый» регион, необходимый для связывания с мишенью, составляет 8–12 нуклеотидов [6]. Экспериментально установлено для *E. coli*, что оптимальная длина ASOs составляет 10–12 оснований [7]. Однако необходимо дополнительно провести эксперименты и на других бактериях, а также изучить побочные эффекты этих препаратов, в том числе возможность ASOs проникнуть в ядро эукариотической клетки и индуцировать повреждение DNA. Современные методы секвенирования RNA позволяют оценить изменение уровней экспрессии мRNA и соотношение отдельных видов или микробных сообществ не только в культуре *in vitro*, но и внутри клетки или ткани эукариотического хозяина [8]. Недавно были опубликованы данные международного исследования RNA-интерактомов [9] по расшифровке закономерностей продуктивного спаривания sRNA–мRNA внутри бактериальных клеток, что позволит использовать полученные знания об эндогенных sRNA при дизайне антибактериальных препаратов на основе ASOs. RNA – довольно нестабильные молекулы, поэтому в качестве ASOs предложено использовать модифицированные нуклеиновые кислоты с улучшенной стабильностью и устойчивостью к нуклеазам: заблокированные нуклеиновые кислоты (*locked nucleic acid*, LNA), фосфородиамидатные морфолино олигомеры (*phosphorodiamidate morpholino oligomer*, PMO) и пептидо-нуклеиновые кислоты (*peptide nucleic acid*, PNA). Последние представляют собой комплексы с короткими (<30 аминокислот) пептидами-носителями преимущественно катионной или амфифильной природы [10]. Многие проникающие внутрь клетки пептиды (CPPs, *cell-penetrating peptide*) способны проникать как в бактериальные, так и в эукариотические клетки, что увеличивает их привлекательность в качестве систем доставки соединений против внутриклеточных патогенов. Последовательность ASO рассчитывают таким образом, что он связывается с мRNA важного для жизнедеятельности бактерии гена в области связывания с рибосомой (*ribosome binding site*, RBS), предотвращая присоединение рибосомной субъединицы 30S и, следовательно, синтез белка. Установлено, что sRNA вызывают ингибирование связывания мRNA с 30S субъединицей рибосомы на рассто-

янии до 50 оснований выше стартового кодона. Математические расчёты показали, что теоретически допустимо создать sRNAs для целевого воздействия на выбранные виды бактерий. Впервые этот тип «программируемого RNA-антибиотика» был описан более трех десятилетий назад в виде очень маленьких олигонуклеотидов, атакующих рибосомальную RNA *E. coli* [11], позже было продемонстрировано, что ASOs размером 9–12 олигонуклеотидов репрессировали мRNA белка биосинтеза незаменимых жирных кислот AcpP [12]. Антимикробные препараты на основе ASOs к настоящему времени уже протестированы в экспериментах *in vitro* или *in vivo* на грамотрицательных и грамположительных бактериях родов *Acinetobacter*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* [13].

Микробиом кишечника человека, который играет важную роль в определении статуса здоровья или болезни макроорганизма – самая разнообразная и метаболически вариабельная часть общего микробиома, содержащая ~1000 уникальных для этого сообщества видов бактерий [14]. Приблизительно 10% генов кишечного микробиома являются важными генами, каждый из них имеет 5′-мRNA область, потенциальную мишень ASOs для ингибирования их трансляции. Показано, что наибольшей эффективностью обладают ASOs, комплементарные области стартового кодона и последовательности Шайн–Далгарно. Однако эти области достаточно консервативны у бактерий и не могут служить мишенью при разработке антимикробных препаратов узкоспецифичного действия. В качестве альтернативного варианта предложены sRNAs, нацеленные на подавление формирования особенностей во вторичной структуре мRNA, необходимых для оптимальной трансляции [14]. Доставка ASOs в бактериальную клетку – задача, которую необходимо решать при создании антибактериальных препаратов. Оболочки бактерий практически непроницаемы для высокомолекулярных олигомеров, так как пориновые структуры не пропускают молекулы размером более 600 Да. Для доставки ~11-мерных ASOs (≥3 кДа) требуется наличие белков-носителей. Важным требованием к таким пептидам является их функциональная нейтральность, чтобы они не вызывали каких-либо стрессов для бактериальных клеток и микробиоты в целом. Кроме того, белки-носители должны доставлять ASOs целенаправленно, с учётом цитоплазматической, мембранной или другой субклеточной локализации экспрессии определенных бактериальных мRNA [15].

К настоящему времени успешно испытаны, в том числе в экспериментах на животных моделях, несколько разных белков-носителей, полученных на основе природных CPPs или природных антимикробных пептидов (табл. 1). Показано, что разные пептиды имеют определенную специфичность – лучше работают либо на грамположительных, либо на грамотрицательных бактериях, что открывает возможности дополнительно использовать этот фактор при создании узкоспецифичных препаратов [16]. Рассматриваются и другие подходы для доставки ASOs в бактериальные клетки: возможность использования внеклеточных везикул, которые описаны у многих видов бактерий как механизм межвидовой коммуникации [17]; использование специфического секреторного белка *Listeria monocytogenes*, который транспортирует RNA этого патогена из бактериальной цитоплазмы в эукариотическую клетку [18]; конструирование фагмид, инкапсулированных в нелитический бактериофаг M13 [19].

Таким образом, существует достаточно доказательств того, что препараты ASOs могут эффективно уничтожить разнообразные бактерии, что продемонстрировано в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Тем не менее ещё предстоит ответить на многие фундаментальные вопросы, чтобы эта технология могла быть использована для точечного редактирования микробиома. В частности, пока остаётся открытым вопрос: будут ли эффективны антибактериальные препараты на основе ASOs против клеток с пониженным уровнем метаболизма – персисторов и биоплёнок [20].

CRISPR-Cas система бактерий. Защита бактерий от мобильных генетических элементов, осуществляемая системами CRISPR-Cas, основана на специфичном узнавании чужеродной DNA или RNA за счёт спаривания с короткими (32–35 нуклеотидов) гидовыми RNA, генерируемыми CRISPR-массивом, с последующим разрезанием целевой последовательности нуклеазой, кодируемой генами *cas* [21]. В последние годы машинерия CRISPR-Cas была предложена для создания систем редактирования геномов. Высокая специфичность систем CRISPR-Cas и возможность их нацеливания на гены антибиотикорезистентности обосновывает их использование в качестве новых антимикробных препаратов, позволяющих атаковать непосредственно гены антибиотикорезистентности и нежелательные патогенные бактерии, не затрагивая других представителей микробиома [22]. Гидовые RNA или CRISPR-RNA (crRNA), нацеленные на генетические детерминанты факторов вирулентности, антибиотикорезистентности

Таблица 1. Антибактериальные препараты, разработанные на основе RNA, и механизм их действия

Наименование препарата	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
Hfq-ассоциированные sRNA	деградации матричных RNA, вызываемые присоединением к ним Hfq-ассоциированных sRNA	*E. coli*, *Salmonella*	[5]
Пептид-PNA конъюгаты	анти-*acpP* PNA конъюгаты инактивируют ген *acpP*, контролирующий синтез жирных кислот	*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*	[7]
ASO-CPP, CPP-PNA и CPP-PMO конъюгаты	стабилизация и доставка к внутриклеточным мишеням RNA-антибиотиков	*E. coli*, *Salmonella enteric*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *K. pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*	[10]
Неионные олигонуклеотиды, комплементарные 3′-концу 16S pRNA	селективное ингибирование синтеза белка и бактериального роста	*E. coli*	[11]
PMO против гена *acpP*	антибактериальные препараты активны на легочной модели инфекции	*Burkholderia cepacia*	[14]
sRNAs OmrA и OmrB	Hfq-зависимое ремоделирование структуры RNA ингибирует трансляцию гена фермента дигуанилатциклазы DgcM (ранее: YdaM), участвующего в регуляции формирования биоплёнки	*E. coli*	[14]
Анти-gyrA PNA	ингибирование роста бактерий препаратом анти-gyrA PNA *in vitro* и на модели инфекции у *Galleria mellonella*	*S. pyogenes*	[16]
Системы CRISPR-Cas I и II типов	использование систем CRISPR-Cas для селективного уничтожения бактерий	*E. coli, Pseudomonas aeruginosa, S. aureus*	[23]
Система CRISPR-Cas с гидовыми RNA против генов β-лактамаз blaSHV-18 или blaNDM-1	специфическое разрезание двунитевой DNA генов *blaSHV-18* или *blaNDM-1*; система доставки – бактериофаг или плазмида	*E. coli*	[24]
Система CRISPR-Cas с гидовыми RNA против гена интимина *eae* энтерогеморрагических эшерихий EHEC	специфическое разрезание двунитевой DNA гена *eae*	*E. coli* O157:H7	[24]
Система CRISPR-Cas, нацеленная на уничтожение плазмид, несущих гены β-лактамаз NDM-1 и CTX-M-15, система доставки – лизогенным бактериофагом	полная элиминация резистентных бактерий из популяции, увеличение чувствительности целевых бактерий к β-лактамным антибиотикам	*E. coli*	[25]

или на существенные хромосомные гены патогенных бактерий, были разработаны для *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. К сожалению, эффективность синтетических crRNA может быть снижена из-за спонтанных точечных мутаций в бактериальных геномах, поэтому необходимо предусмотреть возможность избегать таких эффектов при разработке новых лекарств [23]. В качестве векторов для доставки систем CRISPR-Cas в бактериальные клетки были испытаны фаговые частицы, специфичные для бактерий-мишеней, и конъюгативные плазмиды [24]. Интересный комбинированный подход использования бактериофагов и систем CRISPR-Cas позволил осуществить увеличение чувствительности целевых бактерий к β-лактамным антибиотикам и обеспечил полную элиминацию резистентных бактерий из популяции [25]. В последние годы появились сообщения о многообещающих вариантах наноносителей для доставки антимикробных систем в бактериальные клетки, например, хитозан разного молекулярного веса и наночастицы золота. Кроме того, предложено использовать эндогенные системы CRISPR-Cas, доставляя в бактерии-мишени только гидовую RNA [26].

ГИБРИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ

С появлением штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью появилась необходимость разработки новой стратегии терапии инфекционных заболеваний. Одним из таких направлений является разработка гибридов антибиотиков, которые представляют собой два ковалентно связанных соединения с разным механизмом действия. Такой препарат может быть представлен либо комбинацией двух антибиотиков с разным механизмом действия, либо антибиотиком, ковалентно связанным с адъювантом.

Ковалентная связь гибридного антибиотика может быть расщепляемой или нерасщепляемой. В случае расщепляемой связи гибрид антибиотика представляет собой пролекарство, которое биотрансформируется под влиянием ферментов организма в месте действия. Преимуществом такого подхода является активация антибиотика в целевом сайте назначения, что позволяет использовать меньшие концентрации антибиотика. Применение гибридов антибиотиков, содержащих два слитых антибиотика, даёт дополнительные преимущества комбинированной терапии. Сочетание антибиотика с химическим соединением, которое не обладает антимикробным действием, может быть использовано для получения синергетического эффекта. Такие агенты работают, нацеливаясь на различные этапы в общем биохимическом процессе, улучшая поступление и/или подавляя отток антибиотика. Агенты такого рода назвали антибиотическими адъювантами [27]. Антибиотические адъюванты могут быть направлены непосредственно на бактериальную клетку, способствуя усилению действия антибиотика, или на иммунную систему хозяина, активируя определенные звенья иммунитета, что приводит к активной элиминации патогена из организма.

Антибиотические адъюванты, направленные на бактериальную клетку. Действие антибиотических адъювантов, направленное на блокирование основных механизмов устойчивости к антибиотикам у бактерий, можно разделить на:

а) ингибирование β-лактамаз,

б) ингибирование эффлюксных насосов,

в) регуляцию проницаемости мембраны бактерий,

г) ингибирование патогенности бактерий.

Ингибирование β-лактамаз. Синтез ферментов, способных дезактивировать антибиотики, является одним из механизмов устойчивости, используемых бактериями, чтобы противостоять действию антибиотиков. β-Лактамные антибиотики, первые природные соединения успешно применяемые и впоследствии модифицированные, по-прежнему представляют собой важный класс антибиотиков благодаря их антибактериальной активности и селективности. К ним относятся пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. Вместе с тем за их появлением на рынке быстро последовало распространение устойчивых штаммов в глобальном масштабе. Механизм действия, с помощью которого работают эти антибиотики, основан на инактивации транспептидаз, необходимых для последней стадии биосинтеза клеточной стенки бактерий. Некоторые бактериальные штаммы продуцируют β-лактамазы, которые разрушают β-лактамное кольцо, что приводит к потере эффективности антибиотиков, содержащих эту функциональную группу. Для преодоления устойчивости к β-лактамазе применяются две стратегии: разработка устойчивых к β-лактамазе антибиотиков, например цефалоспоринов и карбапенемов, которые устойчивы к гидролизу β-лактамазами, и разработка селективных ингибиторов β-лактамаз, применяемых совместно с β-лактамным антибиотиком [28]. Выбор ингибитора, который можно комбинировать с определенным β-лактамным антибиотиком, представляет собой сложный этап, на котором необходимо учитывать ряд требований: а) ингибитор должен защищать антибиотик от ферментативного гидролиза, б) доза ингибитора должна быть достаточной для обеспечения защиты антибиотика от ферментов и в) препарат должен сохранять стабильность и активность.

Комбинация амоксициллина и клавулановой кислоты по-прежнему широко используется в терапии инфекционных заболеваний [29]. Впоследствии в клиническую практику были введены тазобактам и сульбактам. В 2015 г. FDA было одобрено применение авибактама в комбинации с цефтазидимом, которые ингибируют многие клинически значимые лактамазы класса A и C, а также ограниченное количество ферментов класса D, таких как OXA-48 [30]. В 2018 г. для борьбы с мультирезистентными бактериями, такими как *Acinetobacter baumannii*, характеризующимися разнообразием β-лактамаз класса D, были одобрены к применению две новые комбинации ингибиторов карбапенем-β-лактамазы: имипенем-релебактам и меропенем-ваборбактам [31] Конъюгированный с пептидом PMO был сконструирован для селективного ингибирования экспрессии NDM-1, что снизило минимальную ингибирующую концентрацию меропенема для грамотрицательных бактерий и увеличило выживаемость в модели мышиного сепсиса [32]. Комбинация цефепима с ингибитором β-лактамазы VNRX-5133VNRX-5133 по-

казала сильную антибактериальную активность в отношении устойчивых к карбапенему Enterobacteriaceae и *Pseudomonas aeruginosa* [33].

Ингибирование эффлюксных насосов. Наиболее широко используемой стратегией для борьбы с антибиотикорезистентностью является разработка ингибиторов эффлюксных насосов, которые предназначены для комбинированной терапии со специфическими антибиотиками. Эффлюксные насосы, располагающиеся в клеточной мембране некоторых видов бактерий, после проникновения антибиотика в клетку откачивают его обратно, из-за чего лекарство не может достигнуть необходимой концентрации и уничтожить микроорганизм. В качестве ингибиторов выступают небольшие молекулы, которые способны блокировать функции эффлюксных насосов. Ингибиторы эффлюксных насосов, как правило, не обладают антибактериальной активностью, поэтому эти соединения дополнительно тестируются на синергизм с антибиотиками в различных концентрациях. Высокую эффективность ингибиторы эффлюксных насосов будут проявлять при совместной терапии с антибиотиками классов макролидов, фторхинолонов и тетрациклинов, действие которых проявляется при проникновении внутрь бактерии. На сегодняшний день не зарегистрировано ни одного препарата, ингибирующего эффлюксные насосы, что связано с часто проявляемой ими токсичностью. Тем не менее работы в этом направлении продолжаются. Например, соединения карвотацетона, выделенные из *Sphaeranthus africanus*, оказывали сильное антибактериальное действие на *Mycobacterium aurum* и *Mycobacterium bovis BCG* и ингибировали эффлюксные насосы микобактерий, что позволяет их рассматривать, как многообещающий адъювант в терапии туберкулеза или других нетуберкулезных микобактериальных инфекций [34].

Протонофор карбонилцианид м-хлорфенилгидразин также способствовал усилению эффективности антибиотикотерапии бактерий Enterobacteriaceae за счёт снижения продукции АТФ и увеличения проницаемости мембран [35].

Регуляция проницаемости мембраны бактерий. Обычно антибиотики, используемые в терапии, оказывают своё антибактериальное действие, поражая соответствующие мишени внутри клетки. Это требует проникновения антибиотика через бактериальную мембрану (мембраны) внутрь клетки. Дополнительная наружная мембрана у грамотрицательных бактерий, которая в основном состоит из полианионных липополисахаридов и поринов, ограничивает проникновение антибиотиков. Как следствие, некоторые антибактериальные препараты проявляют пониженную эффективность при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Известно, что два механизма проникновения антибиотиков через бактериальную стенку зависят от химической природы антибактериального препарата. Первый основан на применении гидрофобных соединений (таких как макролиды и рифампицин), которые пересекают липидный бислой через пассивные транспортные механизмы. Второй используется гидрофильными молекулами (например, β-лактамы, фторхинолоны и фениколовые антибиотики), которые диффундируют через активные транспортные механизмы, используя их способность взаимодействовать с особыми поринами. В этом контексте бактериальная наружная мембрана представляет собой потенциальную мишень, в ряде случаев способную противостоять проникновению антибиотика. Для увеличения способности антибиотика проникать через мембрану могут использоваться адъюванты. В качестве адъювантов такого типа эффективно могут применяться пермеабилизаторы, представляющие собой катионные и амфифильные молекулы или хелаторы, которые, взаимодействуя с полианионными липополисахаридами или захватывая катионы внешнего слоя, дестабилизируют стенку мембраны и таким образом увеличивают вероятность проникновения антибиотика. Примерами пермеабилизаторов наружных мембран являются полимиксины, такие как полимиксин B, колистин, аминогликозиды, катионные пептиды, производные катионной желчной кислоты или полиамины.

Антибиотики, гибридизованные с сидерофорами, работают по типу «троянского коня». Этот гибрид антибиотика вводит бактерии в заблуждение, чтобы активно транспортироваться в клетку. Сидерофоры – молекулярные соединения, которые выделяют сами бактериальные клетки для обеспечения себя жизненно необходимым железом. Сидерофоры захватывают железо и возвращаются в свою клетку, поглощаясь активными транспортными каналами. Путем мечения антибиотиков хелатирующим железо сидерофором внутриклеточные концентрации лекарственного средства достигают высоких значений благодаря поступлению в клетку через бактериальную систему транспорта железа [36]. При конструировании гибридных антибиотиков, связанных с сидерофором, необходимо принимать во внимание различные аспекты. Например, учитывать уровень сродства к железу при использовании неродного сидерофора, анализировать стабильность препарата, который

должен сохранять стабильность во внеклеточной среде, но высвобождаться внутри клетки благодаря ферментативной активности, и, наконец, поглощение сидерофора не должно быть затруднено.

Разработан препарат, содержащий новый β-лактамазный ингибитор GT-055, конъюгированный с сидерофором цефалоспорином GT-1. GT-055 активен против β-лактамаз класса A, C, D и некоторых классов B. Добавление GT-1 усиливает действие GT-055 против мультирезистентных штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [37]. Показано также, что препарат, содержащий GT-055, конъюгированный с сидерофором цефалоспорином GT-1, характеризовался повышенной активностью в отношении мультирезистентных штаммов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*, включая мутантные штаммы по поринам и эффлюксной системе [38].

Ингибирование патогенности бактерий. В последнее десятилетие появился новый подход, направленный на снижение патогенности бактерий. В отличие от традиционных противомикробных препаратов, которые действуют, убивая бактерии или блокируя рост бактерий, разрабатываемые препараты нового поколения будут направлены на конкретные факторы вирулентности, которые проявляются бактериями только во время инфекционного процесса (табл. 2). Они несущественны для клеточного цикла бактерий, но они важны для проявления патогенности. Снижение вирулентности/патогенности бактерий значительно облегчит их элиминацию из организма компонентами иммунной системы. Ингибирование патогенности/вирулентности бактерий может быть достигнуто различными путями, например, при воздействии на биосинтез цистеина, белки Quorum sensing (QS) и биоплёнки.

Ингибирование биосинтеза цистеина. Важность цистеиновых биосинтетических ферментов варьируется в течение жизненного цикла патогенов: их активность может быть необязательной во время роста *in vitro* или острых инфекций, но становится незаменимой в течение фазы персистенции [39]. Препараты, способные ингибировать биосинтез цистеина, могут иметь более эффективное потенциальное преимущество в борьбе с бактериями-персисторами в организме человека, чем традиционные антибиотики, предотвращая формирование антибиотикоустойчивости [40]. Важная роль биосинтеза цистеина в формировании устойчивости к антибиотикам была выявлена относительно недавно [41]. В этой связи разрабатываются новые гибриды антибиотиков. Например, модификация 37-мерного антимикробного пептида HBcARD путем включения нового цистеина к его *C*-концу позволила значительно повысить его антимикробную активность [42]. Для повышения эффективности эрадикации *Helicobacter pylori* был разработан препарат, где N-ацетилцистеин использовали в качестве адъюванта при проведении антибиотикотерапии [43].

Ингибирование белков Quorum Sensing (*QS*). У многих бактериальных патогенов рост популяции находится под контролем QS, который представляет собой механизм межклеточной коммуникации, контролирующий проявления фенотипа, в том числе вирулентность. Эта система работает благодаря постоянной секреции сигнальных молекул (называемых аутоиндукторами) каждой отдельной бактерией. Для разработки ингибиторов QS синтезируют химические соединения, имитирующие структуры сигнальных молекул. Например, был синтезирован пептид 31, который снижал уровень межклеточных взаимодействий с участием сигнальных пептидов, т.е. ингибировал QS [44].

Антибиоплёночные препараты. По данным статистики 65–80% случаев бактериальных инфекций протекает с образованием биоплёнок, представляющих собой сообщества микроорганизмов. В фазе роста в условиях инфекции бактерии становятся в 10–1000 раз более устойчивыми к антибиотикам. На основе природных пептидов, таких как человеческий кателицидин LL-37 и бычий пептид индолицидин, были получены синтетические катионные пептиды [45]. Эти соединения обладают способностью ингибировать образование биоплёнок, широким спектром активности, а также могут быть использованы в качестве антибиотических адъювантов, усиливая бактерицидное действие антибиотиков, таких как тобрамицин, цефтазидим, имипенем и ципрофлоксацин [46].

В качестве антибиотических адъювантов могут использоваться также пептиды, некоторые из которых оказывают не только антимикробное действие, но и деградируют внеклеточный полимерный матрикс бактериальных биоплёнок (табл. 2). Например, гепсидин 20 может уменьшать массу внеклеточного матрикса *Staphylococcus epidermidis* и изменять его биоплёночную архитектуру, воздействуя на полисахаридный межклеточный адгезин [47]. Антибиоплёночные пептиды могут подавлять гены, участвующие в образовании биоплёнки и транспорте связывающих белков как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий [48].

Антибиотические адъюванты, направленные на иммунную систему хозяина. Врождённая иммунная система – это первая линия защиты организма от бактериальных инфекций. В отличие

Таблица 2. Гибридные антибиотики и механизм их действия

Наименование препарата	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
Имипенем-релебактам	ингибирование β-лактамаз	*A. baumannii*	[31]
Меропенем-ваборбактам	ингибирование β-лактамаз	*A. baumannii*	[31]
Комбинированные цефепим с VNRX-5133	ингибирование β-лактамаз	Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa*	[33]
Гибриды с тобрамицином	ингибирование эффлюксных насосов	*P. aeruginosa*	[52]
GT-055 в сочетании с сидерофором GT1	усиление проницаемости мембраны бактерий для антибиотиков	*A. baumannii*, *P. aeruginosa, E. coli* и *K. pneumoniae*	[37, 38]
Модифицированный 37-мерный антимикробный пептид HBcARD	ингибирование биосинтеза цистеина	*A. baumannii*	[42]
N-ацетилцистеин	ингибирование биосинтеза цистеина	*H. pylori*	[43]
Пептид 31	ингибирование QS	*P. aeruginosa*	[44]
Гепсидин 20	деградация внеклеточного полимерного матрикса бактериальных биоплёнок	*Staphylococcus epidermidis*	[48]
Синтетические антибиоплёночные пептиды	подавление генов, участвующих в образовании биоплёнки	грамотрицательные и грамположительные бактерии	[48]
Антимикробный пептид LL-37	индукция аутофагии, усиление антимикробного ответа нейтрофилов и подавление синтеза провоспалительных цитокинов и IFN-гамма	*Mycobacterium tuberculosis*	[51]
Тобрамицин, присоединенный к алифатическим углеводородам	селективно индуцируют синтез интерлейкина (IL-8) макрофагами, что усиливает миграцию и активацию лейкоцитов, способствуя эффективной элиминации патогена из организма	*P. aeruginosa*	[53]

от адаптивной иммунной системы, активирующейся через некоторый промежуток времени, врождённая иммунная система незамедлительно реагирует на патогенные микроорганизмы. Это происходит благодаря наличию паттерн-распознающих рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток, прежде всего макрофагах и дендритных клетках. Паттерн-распознающие рецепторы взаимодействуют со структурами, общими для всех бактерий, в результате чего происходит активация иммунокомпетентной клетки и запуск реакций врождённого иммунитета. Паттерн-распознающие рецепторы делятся на три основные категории: Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR) и Nod-подобные рецепторы (NOD). TLR распознают поверхностные и внутриклеточные белки, липиды, RNA, DNA и другие компоненты бактерий. Связывание бактериальной молекулы с TLR запускает сигнальный каскад активации клетки по MyD88-зависимому и/или MyD88-независимому пути, в результате чего синтезируются провоспалительные цитокины и/или интерфероны типа I. RLRs расположены в цитоплазме и способны связываться с DNA/RNA вирусов и внутриклеточных бактерий. Связывание RLRs с компонентами бактерий/вирусов приводит к активации сигнальных путей эукариотической клетки и запуску синтеза интерферонов I типа. NOD-рецепторы представляют собой большое семейство белков, которые формируют мультипротеиновые комплексы в цитоплазме. Их лиганды способны взаимодействовать с мурамилдипептидом, флагеллином бактерий, а также некоторыми белками грибов и вирусов. В результате такого взаимодействия активируется каспаза и происходит превращение про-IL-1b в его активную (провоспалительную) форму. Перечисленные выше эффекторные функции врождённого иммунитета способствуют рекрутингу, активации и дифференцировке иммунокомпете-

нтых клеток, что в итоге способствует элиминации микроорганизмов главным образом за счёт фагоцитоза.

Давно известно, что некоторые пептиды (менее 50 аминокислот в длину) оказывают иммуномодулирующее действие и способны усиливать антимикробную активность врождённой иммунной системы. Изученность спектра действия и механизмов иммуномодулирующих пептидов позволяет их рассматривать в качестве потенциальных компонентов при конструировании гибридных антибиотиков (табл. 2). Так, например, предварительная обработка растворимыми агонистами TLR, такими как Pam3-CSK4 или MALP2 (TLR-2), полиинозинполицитидиловой кислотой (TLR-3), липополисахаридом (TLR-4) или DNA CpG (TLR-9) усиливала защитные механизмы хозяина против патогена за счёт усиления фагоцитоза [49]. Поскольку липополисахарид токсичен и не может рассматриваться в качестве клинического препарата, были исследованы другие лиганды, такие как монофосфориллипид А и аминоалкилглюкозаминидфосфаты, которые показали высокую эффективность в качестве адъювантов [50].

Искусственная стимуляция NOD1 может представлять собой многообещающую стратегию для повышения врождённого иммунитета против бактериальных патогенов особенно во время лечения антибиотиками широкого спектра действия, которое истощает или серьезно изменяет эндогенную микрофлору. Агонисты NOD2 также усиливают фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов брюшины, печени и лёгких. Обработка альвеолярных макрофагов человека мурамилдипептидом NOD2-лиганда индуцирует аутофагию и экспрессию антимикробного пептида LL-37. Активность LL-37 включает усиление антимикробного ответа нейтрофилов и подавление провоспалительных цитокинов и IFN-гамма, повышая защиту от микобактерий [51].

Перспективной парой для создания гибридного антибиотика является тобрамицин. Тобрамицин характеризуется плейотропным механизмом антибактериального действия: блокирует 30S субъединицу рибосом и тормозит синтез белка, а при высокой концентрации разрушает бактериальную мембрану, вызывая гибель клетки. Гибриды, содержащие тобрамицин, проявляют активность в отношении мультирезистентных штаммов за счёт способности тобрамицина ингибировать эффлюксные каналы [52]. Кроме того, тобрамицин, присоединенный к алифатическим углеводородам, обладает иммуномодулирующими свойствами: селективно индуцируют хемокиновый интерлейкин (IL-8) в макрофагах. IL-8 – мощный нейтрофильный хемотаксический фактор, вызывающий миграцию и активацию моноцитов, лимфоцитов, базофилов и эозинофилов, что приводит к эффективной элиминации патогена из организма [53].

Молекулярные механизмы врождённых иммунных реакций активно пытаются использовать для разработки новых противомикробных препаратов. Однако к очевидным рискам применения антибиотических адъювантов, направленных на активацию компонентов иммунной системы хозяина, относятся возможное развитие аутоиммунного состояния с последующим повреждением органов. Поэтому необходимо иметь чёткое представление о механизмах действия специфических лигандов и сигнальных молекул, используемых в качестве компонентов гибридного антибиотика. Список гибридных антибиотиков представлен в табл. 2.

ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ

S. aureus является грамположительным оппортунистическим патогеном, который колонизирует 30–50% человеческой популяции. В настоящее время *S. aureus* приобрел устойчивость практически ко всем антибиотикам и считается одной из главных причин внутрибольничных инфекций главным образом из-за широкого распространения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. *S. aureus* способен занимать самые разнообразные экологические ниши благодаря наличию нескольких адаптационных механизмов, в частности, позволяющих избежать иммунного ответа хозяина и пережить воздействие больших доз антибиотиков [54]. Наиболее известными из адаптационных возможностей данной бактерии являются формирование биоплёнок и внутриклеточное сохранение и размножение.

Биоплёнка как способ надклеточной организации прокариот обладает рядом специфических свойств, обеспечивающих толерантность к антимикробным воздействиям на бактериальные клетки. Известно, что бактериальные клеточные патогены в составе биоплёнки имеют более высокую степень вирулентности в сравнении с их планктонными формами, и по меньшей мере 80% инфекций *S. aureus* ассоциировано с биоплёнками [55]. Внедрение *S. aureus* в эукариотические клетки и последующее внутриклеточное сохранение и размножение непосредственно связано с наличием внутриклеточных

компартментов с низким pH. Находясь внутри клетки, эти бактерии снижают метаболическую активность и в силу ряда других причин проявляют устойчивость к антибиотикотерапии и воздействию иммунных систем организма-хозяина, что во многом объясняет высокую частоту рецидивирующих инфекций, наблюдаемых у *S. aureus* [56].

Таким образом, новые антибактериальные агенты, активные против биоплёнок, внутриклеточных форм и лекарственно-устойчивых штаммов *S. aureus* являются актуальной насущной потребностью практического здравоохранения (табл. 3). Одним из наиболее продвинутых вариантов новых альтернативных антимикробных агентов, способных эффективно бороться с инфекциями *S. aureus*, выступают пептидогликангидролазы (ПГГ) [57]. ПГГ представляют собой ферменты, способные расщеплять специфические связи внутри пептидогликана бактериальной клеточной стенки, вызывая тем самым бактериальный лизис. Этот активный механизм уничтожения *S. aureus* также действует и на метаболически неактивные персистентные и антибиотикорезистентные бактерии [58]. ПГГ разделяют на несколько классов, прежде всего, по происхождению, но наиболее перспективным вариантом для разработки альтернативных антимикробных агентов являются ПГГ, кодируемые геномом бактериофагов и способные вызывать лизис изнутри инфицированных бактерий-хозяев для освобождения вирионов в конце литического цикла фага. Такие бактериофаговые ПГГ часто называют эндолизинами. При воздействии извне рекомбинантные эндолизины быстро и эффективно убивают грамположительные бактерии, разрушая внешний слой пептидогликана [59]. Основные преимущества эндолизинов заключаются в узком спектре действия, что гарантирует воздействие только на определенные виды бактерий, нетоксичности для эукариотических клеток и низком риске развития резистентности вследствие высокой консервативности пептидогликановых связей, мишеней для эндолизинов [60].

Эндолизины имеют модульную структуру, состоящую из *N*-концевых каталитических доменов и одного *C*-концевого SH3b-подобного субстрат-связывающего домена [61]. Наличие модульной структуры облегчает молекулярную инженерию этих белков. Наиболее распространенная архитектура эндолизинов *S. aureus* содержит *N*-концевую эндопептидазу (Cis-His-зависимую амидогидролазу/пептидазу, CHAP), которая расщепляет пептидную связь d-Ala-Gly, затем следует второй каталитический домен – центрально расположенная амидаза-2, которая расщепляет N-ацетилмурамоил-L-аланин амидную связь внутри пептидогликана [62]. Расщепление одной связи, вероятно, приводит к большей доступности других связей в пептидогликане, что объясняет синергизм, наблюдаемый для комбинаций рекомбинантных эндолизинов с различными сайтами расщепления [63].

Известен ряд эндолизинов, способных эффективно разрушать биоплёнки *S. aureus* [64], причём большая их часть имеет структуру, близкую к эндолизину бактериофага LysK [65]. Как правило, данные эндолизины активны против биоплёнок различных клинических штаммов *S. aureus*, но не коагулазонегативных стафилококков [66]. Показано, что в состоянии биоплёнки, так же как и в планктонном состоянии, *S. aureus* не способен формировать устойчивость к эндолизинам [59]. Некоторые эндолизины приводят к деградации биоплёнки *S. aureus* независимо от химического состава внеклеточного матрикса (полисахаридный, DNA или белковый матрикс). Показано, что в ряде случаев происходит полное разрушение полисахаридного матрикса, либо разрушение самого матрикса остаётся неполным, но клетки бактерий всегда оказываются элиминированными [67]. В отличие от антибиотиков, субингибиторные концентрации эндолизинов не индуцируют рост стафилококковой биоплёнки [68].

В биоплёнках стафилококков после обработки эндолизинами не было обнаружено персистирующих бактерий. Выжившие бактерии были чувствительны к эндолизину. Эти результаты согласуются с отсутствием сообщений о бактериях, устойчивых к фаговым эндолизинам, несмотря на многочисленные попытки их отбора [69]. Более того, эндолизины способны элиминировать персистирующие бактерии, предварительно отобранные двумя антибиотиками, рифампицином и ципрофлоксацином [58].

Для эффективного лизиса внутриклеточных *S. aureus* эндолизины должны быть трансдуцированы в эукариотические клетки. Для некоторых эндолизинов проникновение в эукариотическую клетку обеспечивается за счёт собственных свойств, о чем сообщалось для эндолизина PlyC стрептококкового фага [70]. Для эндолизинов *S. aureus* доставка в эукариотическую клетку происходит благодаря слиянию с белковым трансдуцирующим доменом [58]. При этом необходимо учитывать тот факт, что среда в различных компартментах эукариотических клеток, таких как цитоплазма или фаголизосомы, варьирует по множеству параметров, таких как pH, ионная сила и осмотическое давление. Это

Таблица 3. Эндолизины бактериофагов и механизм их действия

Наименование препарата или действующего агента	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
CF-301/Contrafect NCT03163446 NRephasin/Intron Biotechnology NCT03089697 P128/GangagenNCT01746654 Staphefekt/Micreos NCT02840955	гидролиз пептидогликана	*S. aureus*	[60]

создаёт, в свою очередь, различные проблемы для проявления литической активности эндолизинов. Вместе с тем было показано, что химерные эндолизины с белковым трансдуцирующим доменом являются многообещающими антибактериальными агентами, способными эффективно удалять внутриклеточные *S. aureus* [71]. Был продемонстрирован синергизм во внутриклеточных компартментах при комбинировании эндолизинов с различными каталитическими активностями.

Эндолизины бактериофагов, обладают уникальным преимуществом активного и быстрого литического механизма, характеризующегося высокой эффективностью в отношении устойчивых к антибиотикам бактерий, метаболически неактивных персисторов и биоплёнок [58]. Очевидно, что нативные эндолизины, будучи оптимально приспособленными для выполнения своей природной функции, имеют ряд недостатков с точки зрения использования их как антимикробных агентов. Однако любые изменения естественных структур эндолизинов могут влиять на их активность, причём степень такого влияния зависит от индивидуального белка и типа модификации [72]. Причинами этого могут быть стерическое несоответствие при рецепторной или каталитической активности, изменения в локальном распределении заряда или третичной структуре. Исследования показали, что использование генной инженерии для создания химерных конструкций, несущих функциональные домены различного происхождения, способно приводить к получению эндолизинов с новыми и оптимизированными свойствами [73]. В процессе анализа литической активности химерных эндолизинов была установлена специфика действия функциональных доменов в различных условиях, разработана методология поиска оптимальных комбинаций функциональных доменов. В настоящее время первые рекомбинантные эндолизины проходят клинические испытания как антимикробные агенты против *S. aureus* [60].

НАНОМАТЕРИАЛЫ

В настоящее время наномодифицированные поверхности все более активно используются как бактерицидные и иммуномодулирующие инструменты при переходе к персонализированной медицине и технологиям здоровьесбережения. Значительная доля госпитальных инфекций связана с бактериальной контаминацией медицинских устройств и материалов. Применение биомедицинских имплантатов значительно увеличивает риск заражения организма. Несмотря на то что микробиологическая контаминация постоянно минимизируется современными процедурами стерилизации, часто наблюдаются постоперационные вспышки бактериальных инфекций после установки имплантата. Каждый год более 1000 тонн устройств на основе титана (Ti) имплантируется пациентам [74]. Ti и его сплавы чаще всего используются для ортопедических имплантатов, включая кости и суставы, устройства для фиксации перелома и зубные имплантаты благодаря их прочности, стабильности, высокой коррозионной стойкости (из-за образования тонкого слоя оксида титана), низкого модуля упругости и биосовместимости. Более того, оксид титана обладает остеоиндуктивными свойствами [75]. Две основные проблемы сопровождают операцию по замене поврежденной или больной костной ткани – недостаточная остеоинтеграция и возникновение инфекций. Согласно данным FDA и Medtech Europe, в настоящее время на глобальном рынке представлено более 500 000 видов медицинских устройств [76]. Инвазивные медицинские устройства, включая стационарные и имплантируемые устройства, представляют собой лишь часть этого списка. Так, применение цереброспинальных шунтов и различного типа катетеров во всем мире составляет сотни миллионов [77]. Кроме того, имплантируется более миллиона сердечно-сосудистых электронных устройств и выполняется 10 миллионов процедур имплантации зубов [78].

Согласно данным Arciola et al. [79], в мире используется около миллиарда имплантируемых медицинских устройств, связанных с риском инфицирования, тем не менее интенсивность использования таких устройств растёт с каждым годом.

Разработка и изготовление биосовместимых антибактериальных поверхностей по-прежнему остаётся актуальной задачей, решение которой позволит значительно улучшить качество здравоохранения и жизни человека. Инженерия поверхности является мощным инструментом, который позволяет придать поверхности нужные сочетания физических, химических, механических и биологических характеристик, не затрагивая объёмные свойства материала. Существует четыре основных типа антибактериальных поверхностей, предназначенных для борьбы против возбудителей инфекции. Основными механизмами бактерицидной активности являются: (а) высвобождение бактерицидных агентов, (б) антиадгезия (препятствие сорбции бактерий на поверхности), (в) локальное изменение pH и (г) гибель бактерий при непосредственном контакте бактерий с поверхностью (табл. 4). Модифицированные наночастицами поверхности могут убивать бактерии и грибы за счёт генерации активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА) [75, 80]. АФК и АФА вызывают перекисное окисление липидов цитоплазматической мембраны. Кроме того, они могут вызывать повреждение внутриклеточных белков и нуклеиновых кислот. Идеальные наноповерхности должны обладать бактерицидной и фунгицидной активностями, но при этом быть инертными к клеткам животных и человека и не индуцировать иммунные ответы.

Стратегия на основе высвобождения подразумевает наличие антимикробных агентов, таких как наночастицы металлов различных типов антибиотиков, четвертичных соединений аммония, галогенид-родственных соединений, оксид азота и хитозана. Подход к высвобождению антибиотиков имеет определенные ограничения, такие как краткосрочный антибактериальный эффект, множественная лекарственная устойчивость и, возможно, побочные эффекты. Контролируемый выход металлических ионов трудно смоделировать, потому что выход ионов зависит от концентрации бактерицидного элемента и дополнительных факторов, таких как состояние агломерации металла, шероховатости поверхности и кинетики поверхностного окисления [81]. Недавние исследования чётко показали отсутствие прямой корреляции между бактерицидным ионным выщелачиванием и антибактериальными свойствами [82].

Успехи в области бионанотехнологий открывают новые возможности в науке, биотехнологии и медицине. Наличие бактерицидной активности у наночастиц серебра является важной особенностью для борьбы с патогенными микроорганизмами. Наноматериалы на основе серебра оказывают свой бактерицидный эффект преимущественно за счёт высвобождения ионов серебра (в чистом виде или в комплексе) с последующим увеличением проницаемости мембран, потерей протонной движущей силы, что приводит к потере энергии клеткой и оттоку фосфатов, к утечке клеточного содержания и нарушению репликации DNA. В настоящее время наночастицы серебра рассматриваются как альтернатива антибиотикам, поэтому они активно изучаются как бактерицидные агенты. Ионная имплантация серебра и платины на тонкий слой оксида титана приводит к увеличению бактерицидной активности и улучшению остеоинтеграции имплантата [75]. Низкая цитотоксичность наночастиц серебра имеет большое значение для приживления имплантатов, имеющих модифицированную наночастицами поверхность. Для понижения концентрации серебра используются наноиглы на поверхности с последующей их модификацией наночастицами Ag. Такой способ получения покрытия приводит к высокой бактерицидной активности при низкой концентрации серебра [75].

Новые гибридные наноматериалы являются ключевыми компонентами современных биоматериалов следующего поколения (табл. 4). Их уникальные свойства определяются синергетическими эффектами различных нанокомпонентов. В последние годы бор-нитридные наноструктуры (BN) находятся в центре внимания благодаря их использованию при синтезе сверхлегких металлов и новых керамических поверхностей, полимеров с улучшенной теплопроводностью и механической прочностью, прозрачных супергидрофобных плёнок, при создании новых систем доставки лекарств и многим другим эффективным применениям [83]. Наноматериалы BN также используются для разработки передовых гибридных наноструктур. Интерес к BN обусловлен их уникальными физико-химическими свойствами, которые включают высокую гидрофобность, тепло- и электроизоляцию, стойкость к окислению, антиокислительную способность, теплопроводность, высокую химическую стабильность, механическую прочность и способность к накоплению водорода. Они также используются в качестве антибактериальных агентов, защитных покрывающих агентов, смазывающих веществ, агентов для бор-нейтронозахватной терапии, наноносите-

лей для доставки лекарств и для рецепторной фазы в хемосенсорах [84]. Прямое связывание целевых лигандов или биологически активных молекул к BN наноматериалам затруднено из-за присущей данным материалам гидрофобности. Для преодоления данной проблемы могут быть использованы металлические линкеры, такие как наночастицы золота или серебра (NP) [85]. Другие перспективные приложения BN наноматериалов могут быть применены при изготовлении квантовых электронных устройств [86] и носителей катализатора. Наногибриды Ag/BN также представляют большой интерес как фотокатализаторы и молекулярные зондовые сенсоры [87], помимо использования в качестве антибактериальных средств [88]. Использование сложных наноструктур в качестве бактерицидного элемента является перспективным и быстро развивающимся направлением (табл. 4). Однако известно, что Ag-NP легко агрегируются. Это приводит к ухудшению их химических свойств и потере антибактериальной активности [89]. Использование наночастиц нитрида бора может не только помочь преодолеть эту проблему, но также будет способствовать увеличению антимикробной активности по сравнению с другими наносоединениями [90].

Изучение и разработка новых материалов с бактерицидной активностью интенсивно развиваются в настоящее время. «Материалы будущего» должны обладать биосовместимостью и антибактериальной активностью [91]. Биодеградируемые нановолокна являются перспективными кандидатами «материалов будущего». Они пропускают кислород, но предотвращают проникновение микроорганизмов. Такие материалы перспективны для обработки раневых поверхностей. Однако для повышения эффективности защиты раны от инфекции нановолокна должны проявлять высокую антибактериальную активность. Для увеличения антибактериальной активности нановолокон используют несколько стратегий. Одна из них – растворение бактерицидных агентов в смеси, применяемой для получения химических нановолокон (табл. 4). Эта простая стратегия позволяет загрузить большое количество бактерицидного агента, который может выйти в окружающую среду в течение небольшого промежутка времени, вызвав кратковременный антибактериальный эффект [92]. Применение наночастиц на основе гидроксиапатита [93] – более сложный метод, но нагрузка бактерицидным агентом при таком подходе низкая. Применение хитозана, не обладающего бактерицидной активностью, с последующей иммобилизацией на нем антибактериальных агентов показывает высокую бактерицидную активность. Однако и при таком подходе наблюдается кратковременный бактерицидный эффект [94]. В настоящее время ведутся поиски систем с пролонгированным бактерицидным действием. Весьма интересным направлением является разработка биодеградируемых нанополимеров, модифицированных антибиотиками. Такие полимеры обладают высокой бактерицидной активностью и пролонгированным действием [95].

Наночастицы на основе сульфидов и оксидов металлов (Ag_2S, CuS, FeS, диоксид титана, оксид серебра, оксид цинка и др.), а также поверхности, легированные металлами, оксидами и сульфидами металлов, активно используются для подавления болезнетворной микрофлоры [96]. Однако до сих пор остаются интригующими вопросы: можно ли обеспечить антибактериальную активность только за счёт наногальванического эффекта или добиться синергетического эффекта за счёт сочетания наногальванического эффекта и высвобождения ионов бактерицидов. Предварительные исследования указывают на возможность бактерицидного действия за счёт протекания наногальванических реакций на поверхности [97].

Следует учитывать, что в дополнение к риску бактериальных инфекций, существует также риск грибковой инфекции [98]. Исследование фундаментальных взаимодействий между наночастицами и клетками грибов является ключевым в определении судьбы и поведения наноматериалов, разработанных для применения противомикробных препаратов. Важно отметить, что присутствие ионов Ag, образованных наномодифицированными поверхностями, усиливает действие противогрибкового антибиотика амфотерицина B [99]. Таким образом, имплантаты с включением наномодифицированных ионов Ag и загруженные смесью антибиотиков обеспечивают инновационные биоконструкции, которые одинаково эффективны против бактериальных и грибковых возбудителей. Поэтому комплексная оценка бактерицидной, фунгицидной и иммуномодулирующей активности новых сложно организованных поверхностей является важной задачей для снижения потерь от социально значимых заболеваний.

Бактерицидная активность наномодифицированных поверхностей интенсивно изучается в нашей стране с использованием всевозможных способов модификации: лазерное нано- и микротекстурирование поверхностей для ухудшения смачивания, придание наношиповидной топографии, повреждающей бактериальные мембраны, создание поверхностного гетерослоя из цитотоксичных наночастиц [100].

Таблица 4. Бактерицидные наноматериалы и механизм их действия

Наименование препарата или действующего агента	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
Наночастицы на основе металлов, поверхности, легированные металлами, оксидами металлов и сульфидами металлов	АФК и прямое ингибирование ферментов, разрушение клеточной стенки и цитоплазматической мембраны	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[96]
Ag+Pt	АФК и прямое ингибирования ферментов	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[75]
BN	наношиповидная топография, генерация АФК	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[85]
Нановолокна (модифицированные антибиотиком или бактерицидным агентом)	антибиотик, бактерицидный агент	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[95]
Pt-Fe на подложке TiCaPCON	наногальваника	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[97]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ – ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НАПРАВЛЕНИЯ

Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекций является важной глобальной проблемой; назрела необходимость разработки альтернативных инновационных антибактериальных препаратов. Перспективным направлением создания таких препаратов является использование синтетических некодирующих RNA (sRNA) и гидовых CRISPR-Cas-ассоциированных RNA (crRNA). Оба этих типа RNA могут быть нацелены на инактивацию эпидемически значимых в настоящее время генетических детерминант антибиотикорезистентности. Используемая методология позволяет одновременно программировать инактивацию нескольких мишеней, что повышает степень эффективности новых антибактериальных препаратов. Достижения в области изучения sRNA и систем CRISPR-Cas на настоящем этапе позволяют рассматривать их в качестве новых классов антимикробных препаратов, которые открывают возможности не только для лечения инфекций, вызванных MDR-патогенами, но и для изучения микробных консорциумов и контроля промышленных ферментаций. Расширяющиеся знания о молекулярных механизмах врождённых иммунных реакций активно пытаются использовать для разработки новых противомикробных препаратов. Однако к очевидным рискам применения антибиотических адъювантов, направленных на активацию компонентов иммунной системы хозяина, относятся возможное развитие аутоиммунного состояния с последующим повреждением органов. Поэтому необходимо иметь чёткое представление о механизмах действия специфических лигандов и сигнальных молекул, используемых в качестве компонентов гибридного антибиотика. Весьма перспективным направлением можно считать эндолизины бактериофагов как эффективный противомикробный препарат против устойчивых к антибиотикам бактерий, метаболически неактивных персисторов и биоплёнок. Наряду с разработкой новых типов антибиотиков необходима комплексная оценка бактерицидной, фунгицидной и иммуномодулирующей активности новых сложно организованных наноповерхностей (в том числе и модифицированных антибиотиками), что является важной задачей для снижения потерь от социально значимых заболеваний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 31 октября 2019 г. № 075-15-2019-1671). Работа С.Г. Игнатова выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора. Работа С.Ю. Филиппович выполнена в рамках госзадания 0104-2019-0024 для ФИЦ биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavardet, D. (2007) Colicin biology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 158-229, doi: 10.1128/MMBR.00036-06.
2. Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Fremont, D. H., Janetka, J. W., Remaut, H., Gordon, J. I., and Hultgren, S. J. (2017) Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist, *Nature*, **546,** 528-532, doi: 10.1038/nature22972.
3. Cattoir, V., and Felden, B. (2019) Future antibacterial strategies: from basic concepts to clinical challenges, *J. Infect. Dis.*, **220**, 350-360, doi: 10.1093/infdis/jiz134.
4. Hesse, S., and Adhya, S. (2019) Phage therapy in the twenty-first century: facing the decline of the antibiotic era; is it finally time for the age of the phage? *Annu. Rev. Microbiol.*, **73**, 155-174, doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062535.
5. Hör, J., Matera, G., Vogel, J., Gottesman, S., Storz, G. (2020) Trans-acting small RNAs and their effects on gene expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, *EcoSal. Plus*, **9**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0030-2019.
6. Gorski, S. A., Vogel, J., and Doudna, J. A. (2017) RNA-based recognition and targeting: sowing the seeds of specificity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 215-228, doi: 10.1038/nrm.2016.174.
7. Goltermann, L., Yavari, N., Zhang, M., Ghosal, A., and Nielsen, P. E. (2019) PNA length restriction of antibacterial activity of peptide-PNA conjugates in *Escherichia coli* through effects of the inner membrane, *Front. Microbiol.*, **10**, 1032, doi: 10.3389/fmicb.2019.01032.
8. Nuss, A. M., Beckstette, M., Pimenova, M., Schmühl, C., Opitz, W., Pisano, F., Heroven, A. K., and Dersch, P. (2017) Tissue dual RNA-seq allows fast discovery of infection-specific functions and riboregulators shaping host-pathogen transcriptomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E791-E800, doi: 10.1073/pnas.1613405114.
9. Melamed, S., Adams, P. P., Zhang, A., Zhang, H., and Storz, G. (2020) RNA-RNA interactomes of ProQ and Hfq reveal overlapping and competing roles, *Mol. Cell*, **77**, 411-425.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.022.
10. Xue, X. Y., Mao, X. G., Zhou, Y., Chen, Z., Hu, Y., Hou, Z., Li, M.-K., Meng, J.-R., and Luo, X.-X. (2018) Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases, *Nanomedicine*, **14**, 745-758, doi: 10.1016/j.nano.2017.12.026.
11. Jayaraman, K., McParland, K., Miller, P., and Ts'o, P.O. (1981) Selective inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis and growth by nonionic oligonucleotides complementary to the 3′ end of 16S rRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1537-1541, doi: 10.1073/pnas.78.3.1537.
12. Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body, *PLoS Biol.*, **14**, e1002533, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
13. Daly, S. M., Sturge, C. R., Marshall-Batty, K. R., Felder-Scott, C. F., Jain, R., Geller, B. L., and Greenberg, D. E. (2018) Antisense inhibitors retain activity in pulmonary models of *Burkholderia* infection, *ACS Infect. Dis.*, **4**, 806-814, doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00235.
14. Hoekzema, M., Romilly, C., Holmqvist, E., and Wagner, E. G. H. (2019) Hfq-dependent mRNA unfolding promotes sRNA-based inhibition of translation, *EMBO J.*, **38**, e101199, doi: 10.15252/embj.2018101199.
15. Kannaiah, S., Livny, J., and Amster-Choder, O. (2019) Spatiotemporal organization of the *E. coli* transcriptome: translation independence and engagement in regulation, *Mol. Cell*, **76**, 574-589.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.013.
16. Barkowsky, G., Lemster, A. L., Pappesch, R., Jacob, A., Krüger, S., Schröder, A., Kreikemeyer, B., and Patenge, N. (2019) Influence of different cell-penetrating peptides on the antimicrobial efficiency of PNAs in *Streptococcus pyogenes*, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **18**, 444-454, doi: 10.1016/j.omtn.2019.09.010.
17. Lee, H. J. (2019) Microbe-host communication by small RNAs in extracellular vesicles: vehicles for transkingdom RNA transportation, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1487, doi: 10.3390/ijms20061487.
18. Hansen, A. M., Bonke, G., Larsen, C. J., Yavari, N., Nielsen, P. E., and Franzyk, H. (2016) Antibacterial peptide nucleic acid-antimicrobial peptide (PNA-AMP) conjugates: antisense targeting of fatty acid biosynthesis, *Bioconjug. Chem.*, **27**, 863-867, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00013.
19. Bernheim, A. G., Libis, V. K., Lindner, A. B., and Wintermute, E. H. (2016) Phage-mediated delivery of targeted sRNA constructs to knock down gene expression in *E. coli*, *J. Vis. Exp.*, **109**, 53618, doi: 10.3791/53618.
20. Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., and Zinkernagel, A. (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 441–448, doi: 10.1038/s41579-019-0196-3.
21. Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 67-78, doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
22. Greene, A. C. (2018) CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense, *Trends Biotechnol.*, **36**, 127-130, doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.021.
23. Bikard, D., and Barrangou, R. (2017) Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 155-160, doi: 10.1016/j.mib.2017.08.005.
24. Citorik, R. J., Mimee, M., and Lu, T. K. (2014) Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1141-1145, doi: 10.1038/nbt.3011.
25. Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., and Qimron, U. (2015) Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7267-7272, doi: 10.1073/pnas.1500107112.
26. Parmeciano Di Noto, G., Molina, M. C, and Quiroga, C. (2019) Insights into non-coding RNAs as novel antimicrobial drugs, *Front. Genet.*, **10**, 57, doi: 10.3389/fgene.2019.00057.
27. Wright, G. D. (2016) Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance, *Trends Microbiol.*, **24**, 862, doi: 10.1016/j.tim.2016.07.008.
28. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., and Spencer, J. (2019) β-Lactamases and β-lactamase inhibitors in the 21st century, *J. Mol. Biol.*, **431**, 3472-3500, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
29. Papp-Wallace, K. M. (2019) The latest advances in β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations for the treatment of gram-negative bacterial infections, *Expert. Opin. Pharmacother.*, **20**, 2169-2184, doi: 10.1080/14656566.2019.1660772.
30. Ehmann, D. E., Jahić, C. H., Ross, P. L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G. K., and Fisher, S. L. (2012) Avibactam is a covalent, reversible, non-b-lactam b-lactamase inhibitor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 11663-11668, doi: 10.1073/pnas.1205073109.

31. Zhanel, G. G., Lawrence, C. K., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., et al. (2018) Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem-b-lactamase inhibitor combinations, *Drugs*, **78**, 65-98, doi: 10.1007/s40265-017-0851-9.
32. Sully, E. K., Geller, B. L., Li, L., Moody, C. M., Bailey, S. M., et al. (2017) Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer (PPMO) restores carbapenem susceptibility to NDM-1-positive pathogens *in vitro* and *in vivo*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 782-790, doi: 10.1093/jac/dkw476.
33. Mo, Y., Lorenzo, M., Farghaly, S., Kaur, K., and Housman, S. T. (2019) What's new in the treatment of multidrug-resistant gramnegative infections? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **93**, 171-181, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.007.
34. Tran, H. T., Solnier, J., Pferschy-Wenzig, E. M., Kunert, O., Martin, L., et al. (2020) Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of carvotacetones from *Sphaeranthus africanus* against mycobacteria, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 390, doi: 10.3390/antibiotics9070390.
35. Osei Sekyere, J., and Amoako, D. G. (2017) Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae, *Front. Microbiol.*, **8**, 228, doi: 10.3389/fmicb.2017.00228.
36. Negash, K. H., Norris, J. K. S., and Hodgkinson, J. T. (2019) Siderophore-antibiotic conjugate design: new drugs for bad bugs? *Molecules*, **24**, 3314, doi: 10.3390/molecules24183314.
37. Tonziello, G., Caraffa, E., Pinchera, B., Granata, G., and Petrosillo, N. (2019) Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases, *Infect. Dis. Rep.*, **11**, doi: 10.4081/idr.2019.8208.
38. Nguyen, L. P., Pinto, N. A., Vu, T. N., Lee, H., Cho, Y. L., Byun, J-H., D'Souza, R., and Yong, D. (2020) *In vitro* activity of a novel siderophore-cephalosporin, GT-1 and serine-type β-lactamase inhibitor, GT-055, against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Acinetobacter* spp. panel strains, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 267, doi: 10.3390/antibiotics9050267.
39. Turnbull, A. L., and Surette, M. G. (2008) L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Microbiology*, **154**, 3410-3419, doi: 10.1099/mic.0.2008/020347-0.
40. Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., Gáspári, Z., Varbanov, M., Philippot, S., et al. (2018) New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: a cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum Q176*, *Sci. Rep.*, **8**, 1751, doi: 10.1038/s41598-018-20002-2.
41. Turnbull, A. L., and Surette, M. G. (2010) Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in Salmonella typhimurium, *Res. Microbiol.*, **161**, 643-650, doi: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.
42. Chen, H. L., Su, P. Y., Kuo, S. C., Lauderdale, T. Y., and Shih, C. (2018) Adding a C-terminal cysteine (CTC) can enhance the bactericidal activity of three different antimicrobial peptides, *Front. Microbiol.*, **9**, 1440, doi: 10.3389/fmicb.2018.01440.
43. Fontes, L. E. S., Martimbianco, A. L. C., Zanin, C., and Riera, R. (2019) N-acetylcysteine as an adjuvant therapy for *Helicobacter pylori* eradication, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD012357, doi: 10.1002/14651858.CD012357.pub2.
44. Schütz, C., and Empting, M. (2018) Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers, *Beilstein J. Org. Chem.*, **14**, 2627-2645, doi: 10.3762/ bjoc.14.241.
45. Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E. C. W., Rehm, B. H. A., and Hancock, R. E. W. (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation, *Infect. Immun.*, **76**, 4176-4182, doi: 10.1128/iai.00318-08.
46. Reffuveille, F., de la Fuente-Núñez, C., Mansour, S., and Hancock, R. E. W. (2014) A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 5363-5371, doi: 10.1128/aac.03163-14.
47. Brancatisano, F. L., Maisetta, G., Di Luca, M., Esin, S., Bottai, D., Bizzarri, R., Campa, M., and Batoni, G. (2014) Inhibitory effect of the human liver-derived antimicrobial peptide hepcidin 20 on biofilms of polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-positive and PIA-negative strains of *Staphylococcus epidermidis*, *Biofouling*, **30**, 435-446, doi: 10.1080/08927014.2014.888062.
48. Pletzer, D., Coleman, S. R., and Hancock, R. E. (2016) Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare, *Curr. Opin. Microbiol.*, **33**, 35-40, doi: 10.1016/j.mib.2016.05.016.
49. Ribes, S., Adam, N., Ebert, S., Regen, T., Bunkowski, S., Hanisch, U.-K., and Nau, R. (2010) The viral TLR3 agonist poly(I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of *Escherichia coli* by microglial cells, *Neurosci. Lett.*, **482**, 17-20, doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.078.
50. Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P. M., Casella, C. R., and Mitchell, T. C. (2007) The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4, *Science*, **316**, 1628-1632, doi: 10.1126/science.1138963.
51. Juárez, E., Carranza, C., Hernández-Sánchez, F., León-Contreras, J. C., Hernández-Pando, R., et al. (2012) NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans, *Eur. J. Immunol.*, **42**, 880-889, doi: 10.1002/eji.201142105.
52. Gorityala, B. K., Guchhait, G., Goswami, S., Fernando, D. M., Kumar, A., Zhanel, G. G., and Schweizer, F. (2016) Hybrid antibiotic overcomes resistance in *P. aeruginosa* by enhancing outer membrane penetration and reducing efflux, *J. Med. Chem.*, **59**, 8441-8455, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00867.
53. Laselva, O., Stone, T. A., Bear, C. E., and Deber, C. M. (2020) Anti-infectives restore ORKAMBI® rescue of F508del-CFTR function in human bronchial epithelial cells infected with clinical strains of *P. aeruginosa*, *Biomolecules*, **10**, 334, doi: 10.3390/biom10020334.
54. Malachowa, N., and DeLeo, F. R. (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*, *Cell Mol. Life Sci.*, **67**, 3057-3071, doi: 10.1007/s00018-010-0389-4.
55. James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., and Stewart, P. S. (2008) Biofilms in chronic wounds, *Wound Rep. Regen.*, **16**, 37-44, doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x.
56. Leimer, N., Rachmuhl, C., Palheiros Marques, M., Bahlmann, A. S., Furrer, A., et al. (2016) Nonstable *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by low pH and sensitized to antimicrobial therapy by phagolysosomal alkalinization, *J. Infect. Dis.*, **213**, 305-313, doi: 10.1093/infdis/jiv388.
57. Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S., and Donovan, D. M. (2012) Endolysins as antimicrobials, *Adv. Virus Res.*, **83**, 299-365, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4.
58. Nakamura, T., Kitana, J., Fujiki, J., Takase, M., Iyori, K., Simoike, K., and Iwano, H. (2020) Lytic activity of polyvalent staphylococcal bacteriophage PhiSA012 and its

endolysin Lys-PhiSA012 against antibiotic-resistant staphylococcal clinical isolates from canine skin infection sites, *Front. Med.*, **7**, 234, doi: 10.3389/fmed.2020.00234.
59. Schmelcher, M., Donovan, D. M., and Loessner, M. J. (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials, *Future Microbiol.*, **7**, 1147-1171, doi: 10.2217/fmb.12.97.
60. Gerstmans, H., Criel, B., and Briers, Y. (2018) Synthetic biology of modular endolysins, *Biotechnol. Adv.*, **36**, 624-640, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009.
61. Schmelcher, M., Tchang, V. S., and Loessner, M. J. (2011) Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity, *Microb. Biotechnol.*, **4**, 651-662, doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00263.x.
62. Becker, S. C., Foster-Frey, J., and Donovan, D. M. (2008) The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA, *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 185-191, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01308.x.
63. Gutierrez, D., Fernandez, L., Martinez, B., Ruas-Madiedo, P., Garcia, P., and Rodriguez, A. (2017) Real-time assessment of *Staphylococcus aureus* biofilm disruption by phage-derived proteins, *Front. Microbiol.*, **8**, 1632, doi: 10.3389/fmicb.2017.01632.
64. Freitas, A. I., Vasconcelos, C., Vilanova, M., and Cerca, N. (2014) Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms, *J. Basic Microbiol.*, **54**, 750-757, doi: 10.1002/jobm.201200603.
65. Melo, L. D. R., Brandão, A., Akturk, E., Santos, S. B., and Azeredo, J. (2018) Characterization of a new *Staphylo-coccus aureus* kayvirus harboring a lysin active against biofilms, *Viruses*, **10**, 182, doi: 10.3390/v10040182.
66. Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., and García, P. (2014) Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5, *PLoS One*, **9**, e107307, doi: 10.1371/journal.pone.0107307.
67. Kaplan, J. B. (2011) Antibiotic-induced biofilm formation, *Int. J. Artif. Organs*, **34**, 737-751, doi: 10.5301/ijao.5000027.
68. Fischetti, V. A. (2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 393-400, doi: 10.1016/j.mib.2008.09.012.
69. Shen, Y., Barros, M., Vennemann, T., Gallagher, D. T., Yin, Y., et al. (2016) A bacteriophage endolysin that eliminates intracellular streptococci, *Elife*, **5**, e13152, doi: 10.7554/eLife.13152.
70. Röhrig, C., Huemer, M., Lorge, D., Luterbacher, S., Phothaworn, P., et al. (2020) Targeting hidden pathogens: cell-penetrating enzybiotics eradicate intracellular drug-resistant *Staphylococcus aureus*, *mBio*, **11**, e00209-20, doi: 10.1128/mBio.00209-20.
71. Olsen, N. M. C., Thiran, E., Hasler, T., Vanzieleghem, T., Belibasakis, G. N., Mahillon, J., Loessner, M. J., and Schmelcher, M. (2018) Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase, *Viruses*, **10**, 438, doi: 10.3390/v10080438.
72. Hjelm, L. C., Nilvebrant, J., Nygren, P. A., Nilsson, A. S., and Seijsing, J. (2019) Lysis of staphylococcal cells by modular lysin domains linked via a non-covalent barnase-barstar interaction bridge, *Front. Microbiol.*, **10**, 558, doi: 10.3389/fmicb.2019.00558.
73. Verbree, C. T., Datwyler, S. M., Meile, S., Eichenseher, F., Donovan, D. M., Loessner, M. J., and Schmelcher, M. (2017) Corrected and republished from: identification of peptidoglycan hydrolase constructs with synergistic staphylolytic activity in cow's milk, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e02134-17, doi: 10.1128/AEM.02134-17.
74. Thukkaram, M., Cools, P., Nikiforov, A., Rigole, P., Coenye, T., et al. (2020) Antibacterial activity of a porous silver doped TiO_2 coating on titanium substrates synthesized by plasma electrolytic oxidation, *Appl. Surf. Sci.*, **500**, 144235, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.144235.
75. Ponomarev, V. A., Orlov, E. A., Malikov, N. A., Tarasov, Y. V., Sheveyko, A. N., et al. (2020) Ag(Pt) nanoparticles-decorated bioactive yet antibacterial Ca- and P-doped TiO_2 coatings produced by plasma electrolytic oxidation and ion implantation, *Appl. Surf. Sci.*, **516**, 146068, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.146068.
76. Feldman, M. D., Petersen, A. J., Karliner, L. S., and Tice, J. A. (2008) Who is responsible for evaluating the safety and effectiveness of medical devices? The role of independent technology assessment, *J. Gen. Intern. Med.*, **23**, 57-63, doi: 10.1007/s11606-007-0275-4.
77. McIntyre, W. F., and Healey, J. S. (2017) Cardiac implantable electronic device infections: from recognizing risk to prevention, *Heart Rhythm.*, **14**, 846-847, doi: 10.1016/j.hrthm.2017.03.027.
78. Andersen, O. Z., Offermanns, V., Sillassen, M., Almtoft, K. P., Andersen, I. H., et al. (2013) Accelerated bone in growth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants, *Biomaterials*, **34**, 5883-5890, doi: 10.1016/ j.biomaterials.2013.04.031.
79. Arciola, C. R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018) Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion, *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 397-409, doi: 10.1038/s41579-018-0019-y.
80. Mukherjee, K., Acharya, K., Biswas, A., and Jana, N. R. (2020) TiO_2 nanoparticles co-doped with nitrogen and fluorine as visible light-activated antifungal agents, *ACS Appl. Nano Mater.*, **3**, 2016-2025, doi: 10.1021/acsanm.0c00108.
81. Atay, H. Y., and Celik, E. (2017) Investigations of antibacterial activity of chitosan in the olymeric composite coatings, *Prog. Org. Coat.*, **102**, 194-200, doi: 10.1016/j.porgcoat.2016.10.013.
82. Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Shvindina, N. V., Zhitnyak, I. Y., Gloushankova, N. A., et al. (2017) Approaches for controlled Ag^+ ion release: influence of surface topography, roughness, and bactericide content, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 4259-4271, doi: 10.1021/acsami.6b15096.
83. Kalmantaeva, O. V., Firstova, V. V., Grishchenko, N. S., Rudnitskaya, T. I., Potapov, V. D., and Ignatov, S. G. (2020) Antibacterial and immunomodulating activity of silver nanoparticles in tuberculosis models on experimental mice, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 226-232, doi: 10.1134/S0003683820020088.
84. Weng, Q., Wang, X., Bando, Y., and Golberg, D. (2016) Functionalized hexagonal boron nitride nanomaterials: emerging properties and applications, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 3989-4012, doi: 10.1039/C5CS00869G.
85. Emanet, M., Sen, Ö., Taşkin, I. Ç., and Çulha, M. (2019) Synthesis, functionalization, and bioapplications of two-dimensional boron nitride nanomaterials, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, 363, doi: 10.3389/fbioe.2019.00363.
86. Han, A., Li, X., Huang, B., Tsoi, J. K.-H., Matinlinna, J. P., Chen, Z., and Deng, D. M. (2016) The effect of titanium implant surface modification on the dynamic process of initial microbial adhesion and biofilm formation, *Int. J. Adhes. Adhes.*, **69**, 125-132.
87. Huang, H., Chang, Y., Lai, M., Lin, C., Lai, C., and Shieh, T. (2010) Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants, *Surf. Coat. Technol.*, **205**, 1636-1641, doi: 10.1016/j.surfcoat.2010.07.096.
88. Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Kiryukhantsev-Korneev, Ph. V., Anisimova, N. Y., Gloushankova, N. A.,

Zhitnyak, I. Y., Benesova, J., Amler, E., and Shtansky, V. D. (2015) Two approaches to form antibacterial surface: doping with bactericidal element and drug loading, *Appl. Surf. Sci.*, **330**, 339-350, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.12.119.
89. Carvalho, I., Henriques, M., Oliveira, J. C., Alves, C. F. A., Piedade, A. P., and Carvalho, S. (2013) Influence of surface features on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Ag-TiCN thin films, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **14**, 035009, doi: 10.1088/1468-6996/14/3/035009.
90. Bai, L. (2015) Nanostructured titanium–silver coatings with good antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by one-step magnetron sputtering, *Appl. Surf. Sci.*, **355**, 32-44, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.07.064.
91. Koci, K., Mateju, K., Obalova, L., Krejcikova, S., Lacny, Z., Placha, D., Capek, L., Hospodkova, A., and Solcova, O. (2010) Effect of silver doping on the TiO_2 for photocatalytic reduction of CO_2, *Appl. Catalysis B-Environ.*, **96**, 239-244, doi: 10.1016/j.apcatb.2010.02.030.
92. Cloutier, M., Mantovani, D., and Rosei, F. (2015) Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities, *Trends Biotechnol.*, **33**, 637-652, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.002.
93. Gao, Y., Truong, Y. B., Zhu, Y., and Kyratzis, I. L. (2014) Electrospun antibacterial nanofibers: production, activity, and *in vivo* applications, *J. Appl. Polym. Sci.*, **131**, 9041-9053, doi: 10.1002/app.40797.
94. Monteiro, N., Martins, M., Martins, A., Fonseca, N. A., Moreira, J. N., Reis, R. L., and Neves, N. M. (2015) Antibacterial activity of chitosan nanofiber meshes with liposomes immobilized releasing gentamicin, *Acta Biomater.*, **18**, 196-205, doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.018.
95. Permyakova, E. S., Polčak, J., Slukin, P. V., Ignatov, S. G., Gloushankova, N. A., Zajíčková, L., Shtansky, D. V., and Manakhov, A. (2018) Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH-anhydride plasma polymers and gentamicin immobilization, *Materials & Design*, **153**, 60-70, doi: 10.1016/j.matdes.2018.05.002.
96. Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., et al. (2020) Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: a review, *Front. Chem.*, **8**, doi: 10.3389/fchem.2020.00341.
97. Ponomarev, V. A., Sheveyko, A. N., Permyakova, E. S., Lee, J., Voevodin, A. A., et al. (2019) TiCaPCON-supported Pt- and Fe-based nanoparticles and related antibacterial activity, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11**, 28699-28719, doi: 10.1021/acsami.9b09649.
98. Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., and Giannini, M. J. S. M. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *J. Med. Microbiol.*, **62**, 10-24, doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.
99. Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Manakhov, A., Zhitnyak, I. Y., Gloushankova, N. A., et al. (2018) Synergistic and long-lasting antibacterial effect of antibiotic-loaded TiCaPCON-Ag films against pathogenic bacteria and fungi, *Mater. Sci. Eng. C*, **90**, 289-299, doi: 10.1016/j.msec.2018.04.068.
100. Saraeva, I. N., Tolordava, E. R., Nastulyavichus, A. A., Ivanova, A. K., Kudryashov, S. I., et al. (2020) A bacterial misericorde: laser-generated silicon nanorazors with embedded biotoxic nanoparticles combat the formation of durable biofilms, *Laser Phys. Lett.*, **17**, doi: 10.1088/1612-202x/ab5fca.

NEW-GENERATION ANTIBIOTICS, BACTERIOPHAGE ENDOLYSINS AND NANOMATERIALS FOR COMBATING PATHOGENS

Review

I. G. Shemyakin[1], V. V. Firstova[1]*, N. K. Fursova[1], I. V. Abaev[1], S. Yu. Filippovich[2], S. G. Ignatov[1], and I. A. Dyatlov[1]

[1] *State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Moscow Region, Russia; E-mail: firstova@obolensk.org*

[2] *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

Received July 12, 2020
Revised September 14, 2020
Accepted September 14, 2020

This review presents various strategies to fight causative agents of infectious diseases. Species-specific programmable RNA-containing antibiotics open up new possibilities for creating next-generation of personalized drugs based on microbiome editing and can serve as a new tool for selective elimination of pathogenic bacterial species while keeping intact the rest of microbiota. Another promising approach in combating bacterial infections is genome editing using the CRISPR-Cas systems. Expanding knowledge on the molecular mechanisms of innate immunity has been actively used for developing new antimicrobials. However, obvious risks of using antibiotic adjuvants aimed at activation of the host immune system include development of the autoimmune response with subsequent organ damage. To avoid these risks, it is essential to elucidate action mechanisms of the specific ligands and signal molecules used as components of the hybrid antibiotics. Bacteriophage endolysins are also considered as effective antimicrobials against antibiotic-resistant bacteria, metabolically inactive persisters, and microbial biofilms. Despite significant advances in the design of implants with antibacterial properties, the problem of postoperative infections still remains. Different nanomodifications of the implant surface have been designed to reduce bacterial contamination. Here, we review bactericidal, fungicidal, and immunomodulating properties of compounds used for the implant surface nanomodifications, such as silver, boron nitride nanomaterials, nanofibers, and nanogalvanic materials.

Keywords: RNA-containing antibiotics, bacterial CRISPR-Cas systems, hybrid antibiotics, endolysins, nanosurfaces

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1633 – 1675

УДК 577.12

КРАТКИЙ СПРАВОЧНИК ПО НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ИНГИБИТОРАМ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ТРАНСЛЯЦИИ*

Обзор

© 2020 С.Е. Дмитриев[1,2,3], Д.О. Владимиров[2], К.А. Лашкевич[1]**

[1] *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия; электронная почта: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия*

[3] *Институт молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия*

Поступила в редакцию 26.08.2020
После доработки 04.10.2020
Принята к публикации 04.10.2020

Эукариотическая рибосома и аппарат кеп-зависимой трансляции являются привлекательными мишенями для противоопухолевой, антивирусной, противовоспалительной и антипаразитарной терапии. В настоящее время известен широкий спектр низкомолекулярных ингибиторов, специфично подавляющих биосинтез белка в клетках эукариот. Большое количество таких веществ обнаруживается среди хорошо изученных антибиотиков, чьё действие направлено на рибосому. Они включают ингибиторы транслокации и пептидилтрансферазного центра, блокаторы рибосомного пептидного туннеля, индукторы ошибок декодирования, преждевременной терминации и сквозного прочтения стоп-кодонов, а также модуляторы связывания компонентов трансляционного аппарата с рибосомой. Отдельного внимания заслуживают низкомолекулярные ингибиторы аминоацил-тРНК-синтетаз, трансляционных факторов и сигнальных путей, ассоциированных с трансляцией, в том числе ингибиторы киназы mTOR. Рибосом-направленные ингибиторы широко применяются для анализа экспрессии генов методом рибосомного профайлинга, при селекции культивируемых клеток, используются в качестве фунгицидов в сельском хозяйстве и как противогрибковые и антигельминтные средства в медицине. С веществами, влияющими на точность распознавания стоп-кодона, связаны надежды в терапии наследственных заболеваний, вызываемых нонсенс-мутациями, и восстановлении функции онкосупрессоров в опухолях. Некоторые ингибиторы биосинтеза белка обнаруживают также свойства геропротекторов. В данном обзоре мы приводим список как хорошо изученных, так и малоизвестных ингибиторов эукариотической трансляции (не касаясь биосинтеза белка в митохондриях и пластидах), дополненный информацией об их непосредственных мишенях и краткой характеристикой механизмов действия. Мы также представляем обновляемую базу данных, которая на данный момент содержит информацию о 370 ингибиторах. База данных размещена по адресу: http://eupsic.belozersky.msu.ru/.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: низкомолекулярные ингибиторы, рибосомные 40S и 60S субчастицы, 4E-BP1, фосфорилирование eIF2α, риботоксический стресс, циклогексимид, харрингтонин, трихотециновые микотоксины, аминогликозиды, рапамицин.

DOI: 10.31857/S0320972520110093

ВВЕДЕНИЕ

Трансляционный аппарат эукариот имеет несколько особенностей, касающихся как структуры его компонентов, так и механизмов трансляционного цикла [1–3]. Несмотря на консервативность функционального ядра, эукариотическая рибосома по своей структуре довольно сильно отличается от бактериальной; имея много общего с рибосомой архей, она тем не менее содержит целый ряд специфических элементов: дополнительных сегментов рРНК,

Принятые сокращения: АРСаза – аминоацил-тРНК-синтетаза; ГАЦ – ГТФаза-активирующий центр; ДЦ – декодирующий центр; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; РПТ – рибосомный пептидный туннель; 5′-TOP – 5′-концевой олигопиримидиновый тракт, 5′-terminal oligopyrimidine tract; ISR – интегрированный стрессовый ответ, integrated stress response.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 11, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

эукариот-специфичных белков и их участков [2, 3]. В ходе эволюции эукариоты выработали уникальные особенности инициации трансляции, терминации и рибосомного рециклинга [1, 4–6]. Наиболее яркой особенностью эукариотической трансляции является кеп-зависимое рибосомное сканирование при инициации трансляции, которое подразумевает посадку 40S рибосомной субчастицы вблизи 5′-конца мРНК (как правило, содержащего m^7G-кеп) и её направленное движение в сторону 3′-конца до обнаружения стартового кодона [1, 5].

Наличие как консервативных, так и специфичных черт обуславливает то, что набор веществ, подавляющих биосинтез белка в эукариотической клетке, включает как универсальные ингибиторы рибосом (действующие, как правило, на представителей всех царств живого), так и эукариот-специфичные блокаторы, направленные либо также на рибосому, либо на другие компоненты трансляционного аппарата. На рибосоме вещества могут связываться с разными участками: с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ), Е-сайтом, рибосомным пептидным туннелем (РПТ) или ГТФаза-активирующим центром (ГАЦ) на 60S субчастице; с декодирующим центром (ДЦ) или другими участками на 40S субчастице; с участками связывания трансляционных факторов и так далее [7–9].

Помимо мишеней и механизма действия, ингибиторы отличаются также по эффекту на полисомы, который легко наблюдать в прямом эксперименте. Те из них, которые блокируют инициацию, но не блокируют элонгацию, как правило, разбирают полисомы; ингибиторы элонгации могут как разбирать, так и стабилизировать полисомы в зависимости от того, действуют ли они на «внутренние» рибосомы в полисоме или только на новоинициировавшие рибосомы (см. ниже). Последний тезис не очевиден и часто вызывает путаницу, когда некоторые вещества, действующие на стадии элонгации (например, харрингтонин и лактимидомицин), называют ингибиторами инициации. Ингибиторы терминации могут вызывать стабилизацию полисом и увеличение в них числа рибосом, но если речь идёт об индукторах сквозного прочтения стоп-кодонов, то влияния на полисомный профиль обычно не наблюдается. То же самое можно сказать и об индукторах нарушений декодирования, влияющих на правильность синтезируемых полипептидов, но не сказывающихся на полисомном профиле. Индукторы преждевременной терминации (пуромицин) закономерно разбирают полисомы. Картина усложняется тем, что некоторые ингибиторы проявляют разные механизмы действия в зависимости от своей концентрации, а при воздействии на живые клетки способны вызывать риботоксический или другие виды стресса, что может изменять характер ответа на ингибитор со временем.

В данном обзоре мы предприняли попытку составить систематизированный список низкомолекулярных ингибиторов эукариотической трансляции, представив их в формате таблиц с минималистичными комментариями (в данной статье) и в формате обновляемой базы данных на сайте НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ: http://eupsic.belozersky.msu.ru/. Наиболее известные или типичные ингибиторы подробно описаны в тексте данной статьи и представлены на рисунке. В силу ограниченности места мы не рассматриваем здесь ингибиторы трансляции в митохондриях и пластидах, поскольку аппарат этих органелл относится к бактериальному типу. Мы также не будем рассматривать ингибиторы белковой природы – вещества типа рицина или дифтерийного токсина, несмотря на их важность и широкую распространённость.

ИНГИБИТОРЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РИБОСОМЫ

Существует несколько типов рибосомных ингибиторов, общих для представителей всех царств живого. Большая их часть направлена на консервативные стадии элонгационного цикла: связывание лигандов, транспептидацию и транслокацию, их мы и рассмотрим в первую очередь (табл. 1). Те из них, которые действуют на рибосомы всех типов, мы будем называть «универсальными ингибиторами». В противном случае речь будет идти об эукариот-специфичных блокаторах рибосомы либо об архей- и эукариот-специфичных («АЭ-») ингибиторах. Специфичность действия определяется, как правило, тонкими различиями в строении места связывания: структурные исследования показывают, что часто достаточно замены одного нуклеотида в рРНК или разницы в единственной аминокислотной позиции рибосомного белка, чтобы конфигурация участка не позволяла ингибитору связаться. Многие из этих веществ были идентифицированы ещё в 60–70-е годы прошлого века благодаря усилиям нескольких групп авторов, среди которых стоит выделить Д. Васкеса, А. Химинеса и С. Пестка. Наш обзор будет охватывать период с конца 60-х годов, ознакомиться же с более ранними работами и историей открытия тех ингибиторов, которые были найдены более полувека назад, можно в старых обзорах упомянутых классиков [10–13].

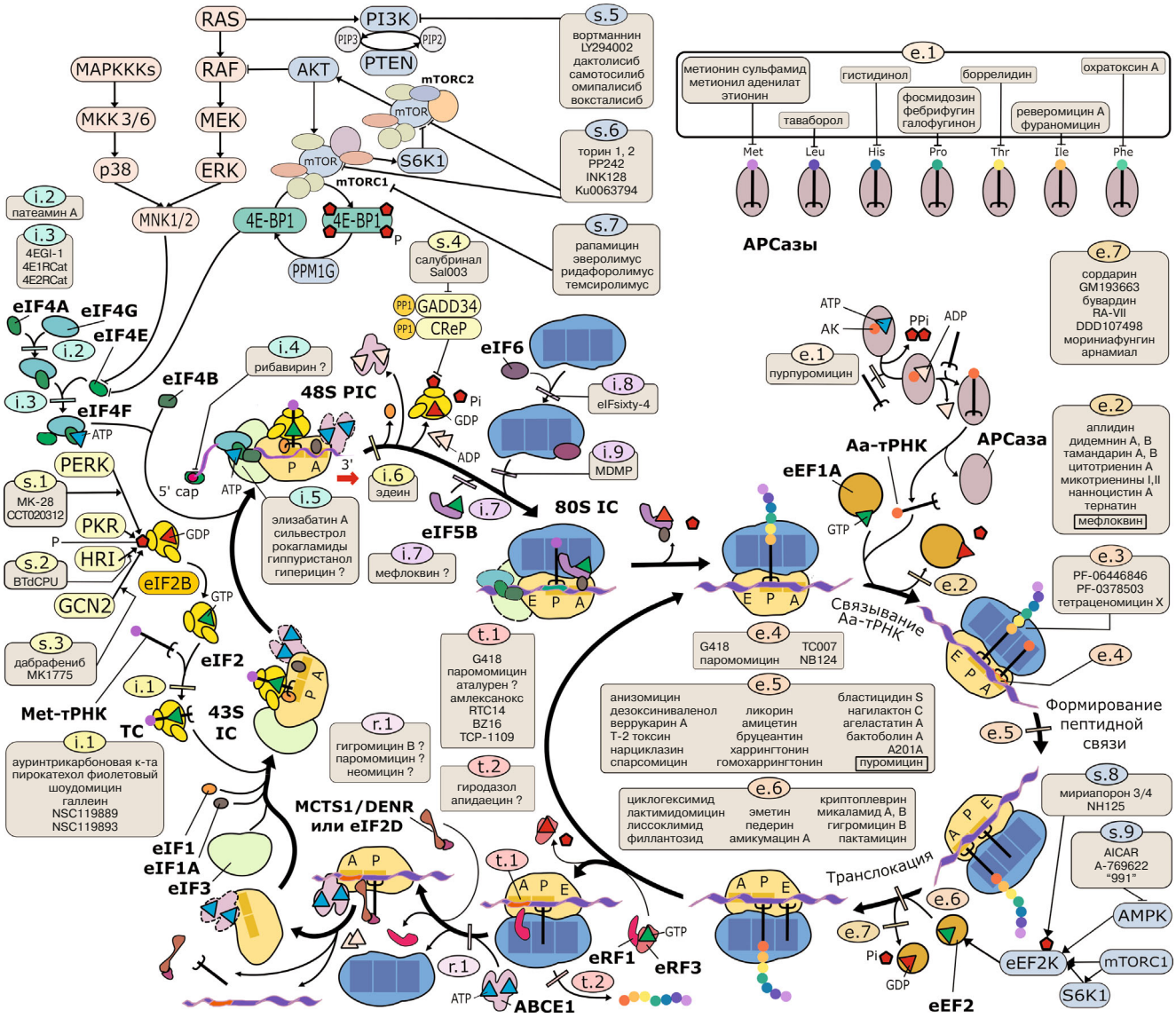


Схема трансляционного цикла эукариот и избранных сигнальных каскадов, регулирующих трансляционную активность, с указанием наиболее широко используемых и хорошо охарактеризованных ингибиторов. Вещества сгруппированы в соответствии со стадиями синтеза белка, в которых участвуют их мишени. Стадии обозначены кодами. Инициация трансляции: i.1 – связывание eIF2 с Met-тРНК$_i$ и образование тройственного комплекса eIF2/Met-тРНК$_i$/GTP (TC); i.2 – взаимодействие eIF4A и eIF4G; i.3 – взаимодействие eIF4E и eIF4G; i.4 – связывание eIF4E с m^{7}G-кепом на 5′-конце мРНК; i.5 – ингибирование хеликазной активности eIF4A при посадке eIF4F на мРНК и последующем рибосомном сканировании; i.6 – узнавание AUG-кодона при сканировании; i.7 – взаимодействие eIF5B с 60S субчастицей; i.8 – взаимодействие eIF6 с 60S субчастицей; i.9 – присоединение 60S субчастицы к 48S преинициаторному комплексу (48S PIC) с образованием 80S инициаторного комплекса (80S IC). Элонгация и сопутствующие реакции: e.1 – аминоацилирование тРНК; e.2 – диссоциация eEF1A/GDP после доставки аминоацил-тРНК (Аа-тРНК); e.3 – продвижение полипептида в рибосомном туннеле; e.4 – декодирование; e.5 – пептидилтрансферазная реакция; e.6 – транслокация; e.7 – диссоциация eEF2/GDP после транслокации. Терминация: t.1 – узнавание стоп-кодона; t.2 – гидролиз пептидил-тРНК. Рециклинг: r.1 – диссоциация 60S субчастицы. Коды модуляторов сигнальных каскадов: s.1–s.3 – активаторы киназ фактора eIF2; s.4 – ингибиторы фосфатаз фактора eIF2; s.5 – ингибиторы киназы PI3K; s.6 – ингибиторы активного центра киназы mTOR; s.7 – аллостерические ингибиторы mTOR в составе комплекса mTORC1. Названия веществ, действующих на ту же стадию, но обладающих принципиально иным механизмом действия, выделены рамкой

Рибосом-направленные ингибиторы элонгации. Подавляющее большинство известных сейчас ингибиторов, мишенью которых является рибосома, действуют на стадии элонгации полипептида. К таким веществам относятся ингибиторы пептидилтрансферазной реакции и транслокации, блокаторы пептидного туннеля, индукторы ошибок декодирования и прежде-

Таблица 1. Низкомолекулярные ингибиторы эукариотической рибосомы

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)#	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания##	Стадия трансляционного цикла###	Эффект на полисомы####	Механизм действия
Анизомицин/ флагецидин (anisomycin/ flagecidin)	пирролидин, группа анизомицина	А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.	ингибитор ПТЦ
Деацетиланизомицин (deacetylanisomycin)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.?	– // –
Пруссин/L-657,398 (preussin)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)?	Э?		– // –
Калонектрин (calonectrin)	трихотецин А		60S?	ПТЦ (А)?	Э	стаб./разб.	– // –
Неосоланиол (neosolaniol)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Скирпентриол (scirpentriol)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.	– // –
Диацетоксискирпенол/ангидин (diacetoxyscirpenol/ anguidine)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	разб.	– // –
Т-2 токсин (T-2 toxin)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	разб.	– // –
НТ-2 токсин (HT-2 toxin)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Т-2 триол (T-2 triol)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Триходермин (trichodermin)	– // –	Э	60S	ПТЦ	Э	стаб./разб.	– // –
Триходермол (trichodermol)	– // –	Э	60S	ПТЦ	Э	стаб.	– // –
Диацетилверрукарол (diacetylverrucarol)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Трихотеколон (trichothecolone)	– // –	Б, А, Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	стаб./разб.	– // – ?
Трихотецин (trichothecin)	трихотецин В	Э	60S	ПТЦ (А)?	Э	стаб./разб.	– // –
Фузаренон X (fusarenon X)	– // –	Э	60S	ПТЦ	Э	стаб.	– // –
Вомитоксин/ дезоксиниваленол (vomitoxin/ deoxynivalenol)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	разб.	– // –
Ниваленол (nivalenol)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	разб.	– // – ?
Кротоцин (crotocin)	трихотецин С	Э	60S	ПТЦ	Э, Т?	стаб.	– // – ?

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)#	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания##	Стадия трансляционного цикла###	Эффект на полисомы####	Механизм действия
Сатратоксин G (satratoxin G)	трихотецин D	Э	60S	ПТЦ (А)	Э?	разб.	– // – ?
Роридин А (roridin A)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Миротецин А (myrothecin A)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Веррукарин А/ мукономицин А (verrucarin A/ muconomycin A)	трихотецин D, мукономицин	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.	– // –
Мукономицин В (muconomycin B)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	стаб.	– // –
Нарциклазин (narciclasine)	тетрагетероциклический алкалоид	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.	– // –
Изонарциклазин (isonarciclasine)	– // –	Б, А, Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э	стаб.	– // –
Ликорин (lycorine)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	?	– // –
Псевдоликорин (pseudolycorine)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	?	– // –
Гемантамин (haemanthamine)	– // –	А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.	– // –
Гемантидин (haemanthidine)	– // –	А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	(стаб.)	– // –
Булбиспермин/гамаин (bulbispermine/ hamayne)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	(стаб.)	– // –
Претацеттин (pretazettine)	– // –	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	стаб.	– // –
Жонквейлин (jonquailine)	– // –	Э?	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Кринамин (crinamine)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	(стаб.)	– // –
Агеластатин А (agelastatin A)	гетероциклический алкалоид	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	?	– // –
Цефалотаксин (cephalotaxine)	гетероциклический алкалоид, группа цефалотаксина	(Э)	(60S)	ПТЦ (А)?	(Э)	(стаб.)	– // – (слабый)
Харрингтонин (harringtonine)	– // –	АЭ	60S	ПТЦ (А)	Э	разб.	– // –

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)#	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания##	Стадия трансляционного цикла###	Эффект на полисомы####	Механизм действия
Гомохаррингтонин/омацетаксин мепесукцинат (homoharringtonine/omacetaxine mepesuccinate)	– // –	А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	разб.	– // –
Нагилактон С (nagilactone C)	дитерпеноид	Э	60S	ПТЦ (А)	Э	разб.	– // –
Нагилактон Е (nagilactone E)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э	?	– // – ?
Бруцеантин (bruceantin)	квассиноид	А, Э	60S	ПТЦ (А)	Э	?	– // –
Грандилактон А (grandilactone A)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э	?	– // –
Грандилактон В (grandilactone B)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э	?	– // –
Брусатол (brusatol)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)	Э?	?	– // – ?
Голакантон (holacanthone)	– // –	Э?	60S	ПТЦ	?	?	– // –
Бакхаринол (baccharinol)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Айлантинон (ailanthinone)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Квассин (quassin)	– // –	Э?	60S?	ПТЦ (А)?	Э?	?	– // – ?
Спарсомицин (sparsomycin)	пиримидон, группа спарсомицина	Б, А, Э	60S	ПТЦ (А, Р)	Э	стаб.	– // –
Дигидроксиспарсомицин (deshydroxy-sparsomycin)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А, Р)?	Э?	?	– // – ?
Октилспарсомицин (octylsparsomycin)	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А, Р)?	Э?	?	– // – ?
Фенолаланинспарсомицин (phenol-alanine sparsomycin)	– // –	Б, А, Э	60S?	ПТЦ (А, Р)?	Э?	?	– // – ?
MDL 19152	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А, Р)?	Э?	?	– // – ?
MDL 20828	– // –	Э	60S?	ПТЦ (А, Р)?	Э?	?	– // – ?
Антелмицин/хикизимицин (anthelmycin/hikizimycin)	нуклеозид, пиримидон	Б, А, Э	60S	ПТЦ (Р)	Э	(стаб.)	– // –

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)#	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания##	Стадия трансляционного цикла###	Эффект на полисомы####	Механизм действия
Бластицидин S (blasticidin S)	нуклеозид, группа бластицидина	Б, А, Э	60S	ПТЦ (Р)	Э	?	– // –
Гугеротин (gougerotin)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ	Э	разб.	– // –
Багугерамин A,B (bagougeramine A,B)	– // –	Б, А, Э?	60S?	ПТЦ?	Э?	?	– // – ?
Амицетин (amicetin)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ	Э	стаб.	– // –
Бамицетин (bamicetin)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ	Э	?	– // –
Милдиомицин (mildiomycin)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ	Э	?	– // –
Пликацетин (plicacetine)	– // –	Б, А, Э	60S?	ПТЦ?	Э?	?	– // – (слабый)
Аргиномицин (arginomycin)	– // –	Б, А, Э	60S?	ПТЦ?	Э?	?	– // – ?
Пуромицин (puromycin)	аминоацил-нуклеозид	Б, А, Э	60S	А	Э	разб.	вызывает преждевременную терминацию
A201A	– // –	Б, А, Э	60S	А	Э		ингибитор ПТЦ
Бактоболин (bactobolin)	изокумарин	Б, А, Э?	60S	ПТЦ (Р)	Э	?	– // –
Актиноболин (actinobolin)	– // –	Б, А, Э	60S	ПТЦ	Э	?	– // –
Амикумацин А (amicoumacin A)	– // –	Б, А, Э	40S	Е-сайт	Э	?	ингибитор транслокации
Бацифелацин (baciphelacin)	– // –	Б, А, Э	?	?	И?	?	?
Ооспонол (oosponol)	– // –	Б, А, Э?	?	?	?	?	?
AHR-1911	тиопсевдомочевина	Б, А, Э	60S?	ПТЦ?	Э		ингибитор ПТЦ
Тенуазоновая кислота (tenuazonic acid)	пирролин	Э	60S?	ПТЦ (А, Р)	?	стаб.	– // –
Ботромицин A2 (bottromycin A2)	циклический пептид	Б, А, Э?	60S?	ПТЦ?	Э?	стаб.?	– // – ?
Гризеовиридин (griseoviridin)	циклодекси-пептид	Б, А, Э	60S	ПТЦ	Э	?	– // – ?
Циклопиазоновая кислота (cyclopiazonic acid)	эрголиновый алкалоид	Б, А, Э	60S?	?	Э	?	– // – ?
PF-06446846/PF846		Б, А, Э	60S	РПТ	Э	?	затрудняет продвижение пептида в РПТ

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)[#]	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания[##]	Стадия трансляционного цикла[###]	Эффект на полисомы[####]	Механизм действия
PF-06378503/PF8503		Э	60S?	РПТ?	Э	?	– // – ?
Тетраценомицин X (tetracenomycin X)	ароматический поликетид тетраценомицинового ряда	Б, А, Э	60S	РПТ	Э?	?	– // – ?
Тетрациклин Col-3 (tetracycline Col-3)	ароматический поликетид тетрациклинового ряда	Б, А, Э	40S, 60S	РПТ и др.	Э?	?	?
Доксициклин (doxycycline)	– // –	Б, А, Э	40S, 60S	РПТ и др.	Э?	?	?
Тигециклин (tigecycline)	– // –	Б, А, Э	40S? 60S?	?	Э	?	связывание аминоацил-тРНК?
Миноциклин (minocycline)	– // –	Б, А, Э	40S? 60S?	?	Э?	?	?
Доксорубицин (doxorubicin)	ароматический поликетид антрациклинового ряда	Э?	?	?	Т	?	способствует сквозному прочтению стоп-кодонов
Циклогексимид/нарамицин A/актидион (cycloheximide/ naramycin A/actidion)	глутаримид	Э	60S	E-сайт	Э	стаб.	ингибитор транслокации
Нарамицин B (naramycin B)	– // –	Э	60S?	E-сайт?	?	?	– // – ?
Ацетоксициклогексимид (acetoxycycloheximide)	– // –	Э	60S	E-сайт?	Э	стаб.	– // – ?
Стрептимидон (streptimidone)	– // –	Э	60S	E-сайт?	Э	?	– // – ?
Стрептовитацин A (streptovitacin A)	– // –	Э	60S	E-сайт?	Э?	стаб.	– // – ?
Актифенол (actiphenol)	– // –	Э	60S?	E-сайт?	Э?	?	– // – ?
Лактимидомицин (lactimidomycin)	– // –	Э	60S	E-сайт	Э	разб.	– // –
Изомиграстатин (isomigrastatin)	– // –	Э	60S?	E-сайт?	Э?	?	– // – ?
ECA-LTM	– // –	Э	60S?	E-сайт?	Э?	?	– // – ?
Стрептоглутаримид H (streptoglutarimide H)	– // –	Б, А, Э	60S?	E-сайт?	Э?	?	– // – ?

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)[#]	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания[##]	Стадия трансляционного цикла[###]	Эффект на полисомы[####]	Механизм действия
Лиссоклимид (lissoclimide)	лабдановый дитерпеноид	Э	60S	E-сайт	Э	стаб.	– // –
Хлоролиссоклимид (chlorolissoclimide)	– // –	Э	60S	E-сайт	Э	стаб.	– // –
Дихлоролиссоклимид (dichlorolissoclimide)	– // –	Э	60S	E-сайт	Э	стаб.?	– // –
Лиссоклимид C45 (lissoclimide C45)	– // –	Э	60S	E-сайт	Э	стаб.	– // – ?
Хатерумаимиды A,N,Q (haterumaimides A,N,Q)	– // –	Э	60S?	E-сайт?	Э	стаб.	– // –
Филлантозид (phyllanthoside)	гликозид	Э	60S	E-сайт	Э	разб.	– // –
S3′-дезацетил филлантозид (S3′-desacetyl phyllanthoside)	– // –	Э	60S?	E-сайт?	?	?	– // – ?
Педерин (pederine)	поликетид, группа педерина	Э	60	E-сайт	Э	стаб.	– // –
Псимберин/ирциниастатин A (psymberin/irciniastatin A)	– // –	Э	60S	E-сайт	Э	?	– // –
Теопедерин B (theopederin B)	– // –	А, Э	60S	E-сайт	Э	?	– // –
Микаламид B (mycalamide B)	– // –	Б, А, Э	60S	E-сайт	Э	разб.	– // –
Микаламид A (mycalamide A)	– // –	Б, А, Э	60S	E-сайт	Э	?	– // –
Оннамид A (onnamide A)	– // –	А? Э	60S	E-сайт	Э	?	– // –
Теданолид (tedanolide)	поликетид, группа теданолида	А? Э	60S	E-сайт	Э	?	– // –
13-дезокситеданоилд/13-DT (13-deoxytedanolide)	– // –	А, Э	60S	E-сайт	Э	?	– // –
Мириапорон 3/4 (myriaporone 3/4)	– // –	А, Э	eEF2?	–	Э	?	(см. табл. 3)
Эметин (emetine)	эметин-подобный пиридоизохинолиновый алкалоид	Э	40S	E-сайт	Э	стаб.	ингибитор транслокации

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)#	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания##	Стадия трансляционного цикла###	Эффект на полисомы####	Механизм действия
Дегидроэметин (dehydroemetine)	– // –	Э	40S?	E-сайт?	Э?	(стаб.)	– // –
Цефалин (cephaeline)	– // –	Э	40S?	E-сайт?	Э?	(стаб.)	– // –
Криптоплеврин (cryptopleurine)	эметин-подобный фенантрохинолизидиновый алкалоид	Э	40S, 60S?	E-сайт	Э	?	– // –
Тилокребрин (tylocrebrine)	– // –	Б? Э	40S?	E-сайт?	Э	?	– // –
Тубулозин (tubulosine)	– // –	Э	40S, 60S?	E-сайт?	Э	?	– // –
Тилофорин (tylophorine/ DCB-3500)	– // –	Б? А, Э	40S	E-сайт?	Э	стаб.	– // –
DCB-3503	– // –	Э	40S?	E-сайт?	Э	?	– // –
Rac-криптоплеврин (Rac-cryptopleurin)	– // –	Э	40S?	E-сайт?	Э	?	– // –
YXM-110	– // –	Э	40S?	E-сайт?	Э	?	– // –
Пактамицин (pactamycin)	аминоциклопентитол, группа пактамицина	Б, А, Э	40S	E-сайт	Э (И?)	(разб.)	– // –
Де-6-MSA-пактамицин (de-6-MSA-pactamycin)	– // –	Б, А, Э	40S?	E-сайт?	Э (И?)	?	– // – ?
Залузанин C (zaluzanin C)	сесквитерпеновый лактон	Э	?	?	Э	?	– // –
Гигромицин B (hygromycin B)	2-DOS аминогликозид, неканонический	Б, А, Э	40S?	ДЦ	Э (Р?)	стаб.	– // –
Генетицин/G418 (geneticin)	2-DOS аминогликозид, 4,6-двузамещённый	Б, Э	40S, 60S	ДЦ, РПТ	Э, Т	разб.	вызывает ошибки декодирования, способствует сквозному прочтению стоп-кодонов и ингибирует транслокацию
Гентамицины (gentamycins/gentamicins)	– // –	Б, Э	40S, 60S	ДЦ, РПТ	Э, Т	разб.	– // –
Тобрамицин (tobramycin)	– // –	Б, Э?	40S, 60S?	ДЦ	Э, Т	разб.?	– // –
Амикацин (amikacin)	– // –	Б, Э	40S	ДЦ	Э, Т	разб.	– // –

Продолжение таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)[#]	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания[##]	Стадия трансляционного цикла[###]	Эффект на полисомы[####]	Механизм действия
Нетилмицин (netilmicin)	– // –	Б, А, Э?	40S?	ДЦ?	Э?	разб.?	– // –
Паромомицин (paromomycin)	2-DOS аминогликозид, 4,5-двузамещённый	Б, Э	40S, 60S	ДЦ	Э, Т (Р?)	разб.	– // –
Ливидомицин (lividomycin)	– // –	Б, А, Э?	40S?	ДЦ?	Э	?	– // –
Неомицин (neomycin)	– // –	Б, А, (Э)	40S?	ДЦ?	Э, Т (Р?)	?	– // –
TC007	– // –	Б, Э	40S, 60S	ДЦ, РПТ	Т	?	– // –
NB74	– // –	Б? Э	40S	ДЦ	Э, Т	?	– // –
NB124	– // –	Б? Э	40S	ДЦ?	Э, Т	?	– // –
NB156	– // –, производное NB74	Б? Э	40S	ДЦ	Э, Т	?	– // –
NB157	– // –, производное NB124	Б? Э	40S	ДЦ	Э, Т	?	– // –
Неамин (neamine)	2-DOS аминогликозид, 4-монозамещённый	Б, Э	60S?	ДЦ	Э, Т	разб.?	– // –
Апрамицин (apramycin)	– // –	Б, Э	40S?	ДЦ	Э	?	– // – ?
Негамицин (negamycin)	группа негамицина	Б, А, Э	40S	?	Т	стаб.	– // –
3-эпи-дезоксинегамицин (3-epi-deoxynegamycin)	– // –	Э	?	?	Т	?	– // – ?
TCP-1109	– // –	Э	40S		Т	?	– // –
Аталурен/PTC124 (ataluren/PTC124)	оксадиазолы	Э	60S?	А?	Т?	?	– // – ?
Амлексанокс (amlexanox)	бензопираны	Э	?	?	Т		– // –
RTC204		Э	?	?	Т	?	– // –
RTC219		Э	?	?	Т	?	– // –
GJ071		Э	?	?	Т	?	– // –
GJ072		Э	?	?	Т	?	– // –

Окончание таблицы 1

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)[#]	Взаимодействующая субчастица рибосомы	Место связывания[##]	Стадия трансляционного цикла[###]	Эффект на полисомы[####]	Механизм действия
GJ103		Э	?	?	Т	?	– // –
RTC13	группа тиазолидинона	Э	40S?	?	Т	?	– // –
RTC14	– // –	Э	?	?	Т	?	– // –
BZ6	– // –	Э	?	?	Т	?	– // –
BZ16	– // –	Э	?	?	Т	?	– // –
CDX5-1	фталимид	?	?	?	?	?	усиливает сквозное прочтение стоп-кодонов, индуцируемое аминогликозидами
Гиродазол/гиролин/RP 49532A (girodazole/girolline)		А, Э	60S	Е-сайт	Т	?	ингибирует высвобождение синтезированного пептида
Сангвинамид B (sanguinamide B)	циклический пептид	Б, А, Э	40S, 60S	uS17, uL3, uL30, др.	?	?	?
Даптомицин (daptomycin)	циклический липопептид	Б, А? Э	40S	eS19	?	?	?
QL-XII-47/QL47	группа QL47	Э	?	?	Э?	?	?
YKL-04-085	– // –	Э	?	?	Э?	?	?
Мефлоквин (mefloquine)	хинолин	Э*	60S	ГАЦ	Э	?	нарушает аккомодацию eEF1A, eEF2
Эдеин A (edein A)		Б, А, Э	40S	Е-сайт	И	?	мешает связыванию или аккомодации инициаторной Met-тРНКi в Р-сайте
Эдеин B (edein B)		Б, А, Э?	40S?	Е-сайт?	И?	?	– // – ?
MDMP		Э	40S? 60S?	?	И	разб.	препятствует присоединению 60S к 48S инициаторному комплексу
eIFsixty-4		Э	60S	?	И	разб.	нарушает связывание eIF6 с 60S субчастицей

Примечание. Буквенные коды:
[#] Б – бактерии, А – археи, Э – эукариоты. (*) обозначает более узкую группу организмов (например, грибы или простейшие).
[##] ПТЦ (А) – А-сайт ПТЦ, ПТЦ (Р) – Р-сайт ПТЦ, остальные сокращения – как в основном тексте.
[###] И – инициация, Э – элонгация, Т– терминация, Р – рециклинг.
[####] Стаб. – стабилизирует полисомы, Разб. – разбирает полисомы, Стаб. / Разб. – стабилизирует или разбирает в зависимости от концентрации.
Знак «?» обозначает «предположительно» (по аналогии с химически сходным веществом, по аналогии с другими организмами либо на основании спорных данных). В скобках – явление, которое менее выражено, чем основное.

временной терминации, а также некоторые другие типы ингибиторов с нестандартными механизмами действия.

Ингибиторы пептидилтрансферазного центра. В силу своей консервативности ПТЦ большой субчастицы рибосомы является наиболее уязвимым местом белоксинтезирующего аппарата – именно там связывается, пожалуй, наибольшее число ингибиторов как у про-, так и у эукариот (рисунок, е.5). Эти ингибиторы могут относиться к разным типам химических соединений и по-разному препятствовать работе рибосомы.

Так, некоторые из них мешают посадке или аккомодации аминоацил-тРНК в А-сайте. К этому типу относятся, например классический АЭ-специфичный ингибитор анизомицин, который связывается в А-сайте ПТЦ и дестабилизирует аминоацил-тРНК [14–17]. С тем же участком связываются эукариот-специфичные трихотециновые микотоксины (производимые паразитическими грибами Т-2 токсин, дезоксиниваленол, веррукарин А и, вероятно, ещё более трёх десятков подобных им соединений, имеющих в своей основе сложный четырёхчленный гетероцикл [14, 17–19]); тетрагетероциклические растительные алкалоиды нарциклазин, ликорин и гемантамин [14, 20] и, предположительно, их многочисленные производные – изонарциклазин, псевдоликорин, претацеттин и другие [21, 22]; а также харрингтонин [23], широко используемый в методике рибосомного профайлинга [24], и близкий к нему гомохаррингтонин [14, 23, 25, 26]. Гомохаррингтонин в форме полусинтетического препарата омацетаксина мепесукцината является одним из очень немногих трансляционных ингибиторов, получивших одобрение как европейского, так и американского медико-биологических агентств (EMA и FDA), он применяется для лечения хронических миелолейкозов [27]. Кроме того, он вошёл в число перспективных лекарств для антивирусной терапии при COVID-19 [28].

Особенностью харрингтонина и гомохаррингтонина является то, что они могут связаться лишь с вакантной рибосомой, только что собравшейся из субчастиц и приступившей к трансляции, и останавливают её сразу (или вскоре) после старта [23]. При этом ранее инициировавшие рибосомы продолжают транслировать, и в итоге на мРНК остаётся только одна 80S рибосома в районе начала кодирующей части [25, 29]. Это позволяет использовать харрингтонин для картирования стартовых кодонов [24].

Нужно заметить, что подобное свойство (неспособность связываться с активно транслирующими полисомами) не является редкостью для ингибиторов элонгации, поэтому на нём стоит остановиться особо. Добавление таких веществ к клеткам приводит не к стабилизации, а к разборке полисом, поэтому в литературе их иногда ошибочно причисляют к ингибиторам инициации [25, 29]. Помимо харрингтонина, подобное влияние на полисомы оказывают, например, некоторые из упоминавшихся выше трихотециновых микотоксинов [25]. В последнем случае это выглядит особенно интригующе: так, Т-2 токсин, веррукарин А, ниваленол и калонектрин разбирают полисомы, а трихотецин, триходермин и скирпентриол их стабилизируют [19, 30, 31]. Были даже найдены конкретные химические радикалы, положение которых в определённых позициях по отношению к ядру трихотецинового антибиотика определяет тот или иной эффект [19, 30, 32]. Впрочем, в случае некоторых микотоксинов эффект может зависеть от концентрации: так, диацетоксисискирпенол и фузаренон X, которые в норме разбирают полисомы, при увеличении концентрации на два порядка начинают их стабилизировать [30, 33]. Способность связываться лишь с вакантной рибосомой и разбирать полисомы присуща и некоторым ингибиторам транслокации – например, лактимидомицину [34], который будет рассмотрен в соответствующем разделе, – на его примере мы и рассмотрим предположительный механизм данного явления.

А-сайт ПТЦ является мишенью и для других соединений, в химическом плане не имеющих практически ничего общего с вышеперечисленными, – веществ природного происхождения – нагилактона С [14, 35] и агеластатина А [36], а также бруцеантина, представителя обширного класса квассиноидов, среди которых много потенциальных антираковых препаратов [26, 37, 38]. Не исключено, что такой же механизм действия имеет нагилактон Е, у которого недавно методами системной биологии была обнаружена активность ингибитора элонгации [39]. Аккомодацию аминоацил-тРНК в А-сайте нарушает также универсальный антибиотик А201А, имеющий нуклеозид-подобный участок, который напоминает ССА-конец тРНК [13, 40].

Некоторые вещества связываются не с А-, а с Р-сайтом ПТЦ. Примерами таких соединений являются универсальные ингибиторы пептидилтрансферазной реакции: бактоболин А (производное изокумарина) [41, 42] и бластицидин S из группы нуклеозидных антибиотиков [14, 17, 43, 44]. Интересно, что в случае бактерий бластицидин S ингибирует не столько элонгацию, сколько терминацию трансляции [45], однако в эукариотической системе его эффект связан всё же именно с подавлением элонгации [46]. Ма-

лоизученные нуклеозидные антибиотики, похожие на бластицидин, – антелмицин (хикизимицин), гугеротин, амицетин, бамицетин и другие [47–49] – также ослабляют связывание аминоацил-тРНК и препятствуют транспептидации [43].

Ещё один нуклеозидный аналог, также взаимодействующий с ПТЦ и сложным образом влияющий на связывание и аккомодацию лигандов, – спарсомицин [17, 18]. Структура его комплекса с эукариотической рибосомой пока недоступна, но есть структурные данные, характеризующие его взаимодействие с большой субчастицей архей [44]. На основании их можно предположить, что антибиотик образует множественные контакты с CCA-концом тРНК в P-сайте, одновременно препятствуя связыванию аминоацил-тРНК.

Следует признать, что ввиду недостатка структурных и функциональных данных зачастую нельзя сказать однозначно, связан ли механизм действия конкретного ингибитора ПТЦ с нарушением связывания или аккомодации лигандов или же с конформационными перестройками в самом ПТЦ, делающими невозможным эффективный катализ. Поэтому обычно не принято подразделять ингибиторы этого типа на более узкие подгруппы согласно стадии, на которой они блокируют элонгационный цикл. Ситуация ещё более усложняется недавно открывшимся фактом аминокислотной специфичности ингибиторов ПТЦ. Например, структурные данные говорят о том, что харрингтонин и его производные, а также трихотециновые микотоксины должны мешать посадке аминоацил-тРНК или как минимум аккомодации аминоацильного остатка в A-сайте [14, 26]; однако данные ту-принтинга и рибосомного профайлинга [50–52] говорят о том, что эти вещества допускают несколько элонгационных циклов, прежде чем рибосома остановится на определённой позиции, зависящей от аминокислотного остатка на *C*-конце пептидил-тРНК, расположенной в P-сайте. Остаётся неясным, как рибосома может синтезировать фрагмент полипептида длиной несколько аминокислот, когда её ПТЦ оккупирован крупной молекулой антибиотика, и почему одни аминокислоты при этом могут встраиваться, а на других происходит остановка синтеза. Аминокислотная специфичность ингибиторов ПТЦ была впервые задокументирована в 2013 году для харрингтонина [50]: методом ту-принтинга было показано, что он предпочтительно останавливает транслирующую рибосому, когда последней аминокислотой, присоединённой к пептидил-тРНК и находящейся в P-сайте, является лизин, аргинин или тирозин. Позднее толерантность к одним аминокислотным остаткам на *C*-конце растущего пептида и чувствительность к другим была выявлена для многих классических ингибиторов ПТЦ, в том числе анизомицина, спарсомицина, бластицидина S и ряда трихотециновых микотоксинов [51]. Аналогичное наблюдение было сделано и для некоторых антибиотиков, блокирующих ПТЦ бактериальной рибосомы [53], хотя в этом случае специфичность касалась аминокислотного остатка, предшествующего тому, что находился в P-сайте: трансляцию останавливал преимущественно аланин (и в меньшей степени серин и треонин) в положении «–1» пептидил-тРНК. Данное явление меняет представления о механизме действия ингибиторов ПТЦ и требует дальнейшего изучения [54].

Ингибиторы, связывающиеся в пептидном туннеле. Специфичность по отношению к последовательности синтезируемого пептида особенно ярко проявляется в случае группы ингибиторов, местом связывания которых служит РПТ. Для бактериальных рибосом таких веществ известно довольно много, их классическим примером являются антибиотики-макролиды [55, 56]. Интересно, что механизм их действия также, по-видимому, связан с угнетением работы ПТЦ: связываясь в пептидном туннеле, макролиды распространяют аллостерическое влияние далеко за его пределы, индуцируя конформационные перестройки внутри 50S субчастицы [57]. Хотя с рибосомами архей некоторые макролиды связать удаётся, и связывание происходит примерно с тем же участком, что и у бактерий [58–60], ни один из известных на данный момент антибиотиков этого типа не способен действовать по такому же механизму на эукариотическую рибосому [56]; известен неканонический макролид 13-дезокситеданолид, который связывается с 60S субчастицей [61], но совсем в другом месте (см. ниже). Тем не менее ингибиторы, связывающиеся в пептидном туннеле 60S субчастицы, недавно были обнаружены среди других классов веществ (рисунок, е.3). Здесь нельзя не упомянуть о двух необычных ингибиторах, PF-06446846 и PF-06378503, проявляющих настолько высокую селективность по отношению к аминокислотной последовательности цепи в пептидном туннеле, что при всём многообразии человеческих белков они блокируют лишь синтез буквально нескольких из них [62, 63]. Структурное исследование комплекса PF-06446846 с рибосомой [64] показало локализацию места связывания в пептидном туннеле и арест транслирующей рибосомы в одном из пратранслокационных состояний. Совсем недавно был обнаружен и ещё один тип ингибиторов,

блокирующих белковый синтез в клетках эукариот путём взаимодействия с пептидным туннелем, – ароматические поликетиды: связывание тетраценомицина X с РПТ рибосомы человека было показано структурными методами, подтверждено в *in vitro* системе и на культивируемых клетках человека [65], а тетрациклинов Col-3 и доксициклина – определено биохимически [66]. Есть также указания и на активность в эукариотической системе некоторых других тетрациклинов: тигециклина [67, 68] и миноциклина [69, 70]; последний может использоваться для лечения аутоиммунных расстройств, нейропатий и вирусных инфекций, а также выступает потенциальным геропротектором. В обоих случаях места связывания с эукариотической рибосомой остаются неизвестными. При этом классический тетрациклин Tet, широко применяемый в медицине как антибактериальный препарат, не блокирует трансляцию в эукариотической системе, а с бактериальной рибосомой связывается совсем в другом месте, чем тетраценомицин X, доксициклин и Col-3 [7].

Ингибиторы транслокации. Вещества, которые блокируют рибосому на стадии транслокации, представляют существенную долю ингибиторов эукариотической рибосомы (рисунок, е.6). Здесь речь также может идти о нескольких механизмах. Классический эукариот-специфичный ингибитор циклогексимид (он же актидион или нарамицин А) препятствует транслокации, оккупируя Е-сайт 60S субчастицы и, по-видимому, мешая перемещению туда деацилированной тРНК из Р-сайта [14, 17, 25, 71–75] – хотя в литературе обсуждался также и другой механизм действия [34, 76]. Циклогексимид широко используется для определения времени полужизни белков, для стабилизации полисом при анализе полисомных профилей в градиенте сахарозы, а также при анализе генной экспрессии методами рибосомного профайлинга и аффинного выделения транслирующих рибосом (TRAP) [77]. Он принадлежит к группе веществ, называемых глутаримидами, среди которых есть и другие ингибиторы биосинтеза белка, изученные гораздо хуже (например, стрептимидон, актифенол, ацетоциклогексимид, стрептовитацин и изомиграстатин) [78–80]. К этой же группе относится лактимидомицин [34, 81], который связывается с тем же местом в Е-сайте, но имеет дополнительное лактонное кольцо, затрудняющее аккомодацию его молекулы [14]. В отличие от циклогексимида, лактимидомицин не способен связываться с активно транслирующими рибосомами, поэтому его добавление к клеткам приводит к разборке полисом [34]. В этом он похож на упоминавшийся ранее харрингтонин, и его тоже используют в рибосомном профайлинге для картирования стартовых кодонов [82]. По-видимому, неспособность лактимидомицина эффективно вытеснять тРНК из Е-сайта связана именно с медленной аккомодацией его крупного бокового радикала [14]. Возможно, эта же причина объясняет и другие случаи, когда ингибиторы элонгации, успешно взаимодействующие с вакантными субчастицами, неактивны по отношению к уже транслирующим рибосомам в полисоме.

Практически с тем же местом на 60S субчастице, что и глутаримидные антибиотики, связываются лиссоклимиды (в частности, хлоролиссоклимид и С45), получаемые из морских моллюсков, – по механизму действия они, вероятно, аналогичны глутаримидам, на которые немного похожи структурно [83–85]. Это же место является мишенью и для другого ингибитора трансляции, имеющего совершенно иную химическую структуру, – филлантозида [14]. Точный механизм его действия неясен [35], однако, скорее всего, он ингибирует именно транслокацию. Его уникальной особенностью является то, что при связывании он, по-видимому, образует ковалентную связь с Е-сайтом рибосомы, вызывая её необратимое повреждение. Здесь же связываются, по-видимому, ингибиторы из обширного класса поликетидов – например, педерины, вырабатываемые симбионтами некоторых ядовитых жуков и морских беспозвоночных: педерин, теопедерин А, оннамид А, микаламиды псимберин и другие [17, 86, 87], хотя надёжные структурные данные были получены только для одного представителя этой группы веществ, микаламида А [60]. Все они также являются ингибиторами транслокации [17, 87, 88]. Другие представители поликетидов – своеобразные макролиды теданолид и 13-дезокситеданолид – также блокируют транслокацию путём связывания с тем же участком в Е-сайте на большой субчастице, что и педерины [61, 89], а вот действие близких им по структуре мириапоронов [90], хотя также происходит на стадии элонгации [91], но опосредуется, как ни странно, не прямым связыванием с рибосомой, а фосфорилированием фактора элонгации eEF2 [92].

Эукариот-специфичные ингибиторы эметин и родственный ему криптоплеврин, а также универсальные антибиотики амикумацин А и пактамицин взаимодействуют с одним и тем же местом на рибосоме – оно тоже находится в районе связывания тРНК в Е-сайте, однако в данном случае речь идёт о малой субчастице [14, 93–97]. Отсутствие структурных данных по их комплексам с эукариотической рибосомой в

присутствии лигандов затрудняет понимание механизма их действия, но он явно отличается от такового для глутаримидов. О способности эметина и криптоплеврина ингибировать транслокацию известно ещё с 70-х годов [17, 25, 98]. Химически сходные с ними цефалин, тилофорин, тилокребрин, тубулозин, DCB-3503 и YXM-110 также являются известными ингибиторами транслокации и связываются, по-видимому, с тем же участком 40S субчастицы [95–97, 99–101]. Эметин уже больше века используется в медицине как антипротозойное (в частности, антиамёбное и противомалярийное) и антигельминтное средство, а недавно он вошёл в список перспективных препаратов для борьбы с коронавирусной инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2 [28].

Амикумацин А, действующий на ту же стадию рибосомного цикла, имеет перспективы в борьбе с онкологическими заболеваниями [93]. На бактериальных комплексах было показано, что этот ингибитор, взаимодействуя одновременно с мРНК и рРНК [102], препятствует перемещению рибосом при транслокации. Поэтому для эукариот, где движение транскрипта в мРНК-канале важно не только при элонгации, но и на стадии сканирования 5′-нетранслируемой области, можно было бы ожидать угнетения инициации трансляции, однако функциональные тесты показали, что это не так: амикумацин А является типичным ингибитором элонгации [93].

Не до конца понятным механизмом действия на эукариотическую рибосому обладает взаимодействующий с тем же участком пактамицин [14, 18, 25]: долгое время существовала неопределённость в том, действует ли он на инициацию или на элонгацию (см. обсуждение в [7, 103]). В конце концов, в случае бактериальной рибосомы было показано, что пактамицин ингибирует транслокацию [104], и наши данные свидетельствуют об аналогичном механизме в эукариотической системе [51]. Кстати, другой антибиотик, связывающийся примерно с тем же районом малой субчастицы, эдеин [14], действительно ингибирует инициацию, и о нём будет рассказано в соответствующем разделе.

Иным механизмом подавления транслокации обладает атипичный аминогликозид гигромицин B. Структурные данные по его связыванию с эукариотической рибосомой отсутствуют, но в случае бактерий он связывается с малой субчастицей в районе декодирующего центра (ДЦ) в спирали h44 и вызывает конформационные изменения, которые препятствуют перемещению мРНК и тРНК между A- и P-сайтами [103, 105]. В эукариотических системах он имеет аналогичную активность [73, 106]. Другие аминогликозиды, несмотря на связывание в этом же участке, имеют иной механизм действия (описанный ниже), однако в высоких концентрациях некоторые из них также вызывают транслокационный блок. Этот феномен хорошо задокументирован для бактериальных рибосом [107, 108] и может быть связан как с заякориванием тРНК в A-сайте при связывании в «классическом» месте посадки аминогликозидов в спирали h44, так и со связыванием в альтернативных участках – в спирали H69 большой субчастицы или в других местах [109, 110]. В эукариотической системе блок транслокации удаётся отследить методом ту-принтинга только при очень высоких концентрациях паромомицина и G418 [51].

В данном разделе можно было бы упомянуть также вещества, блокирующие транслокацию путём нарушения работы фактора элонгации eEF2 (например, сордарин), однако поскольку местом их связывания не является непосредственно рибосома, они будут рассмотрены в отдельном разделе.

Вещества, вызывающие ошибки декодирования. Отдельный класс ингибиторов – вещества, которые уменьшают точность работы рибосомы, вызывая ошибки при встраивании аминокислот (рисунок, е.4). Классическим примером этого типа является обширный класс аминогликозидных антибиотиков [111]. Их основное место связывания на эукариотической рибосоме – спираль h44 в ДЦ малой субчастицы [14, 110]. Это связывание вызывает стабилизацию той конформации, которую рибосома должна принимать лишь при наличии «правильной» аминоацил-тРНК в A-сайте [7]. В результате реакция транспептидации может произойти, даже если там находится не соответствующая кодону тРНК, и в растущий полипептид встраивается неверная аминокислота. Аминогликозиды также индуцируют сквозное прочтение стоп-кодонов, что придаёт им потенциал для терапии заболеваний, вызываемых нонсенс-мутациями (см. ниже).

Наиболее высокую активность против рибосом эукариотического типа демонстрируют аминогликозиды с 4,6- или 4,5-двузамещённым 2-дезоксистрептаминовым (2-DOS) кольцом: прежде всего – генетицин (G418, широко применяющийся для генетической селекции при культивировании эукариотических клеток) и менее активные паромомицин, ливидомицины, гентамицины и амикацин [112–117]. Высокую активность имеют также менее токсичные аналоги G418 и паромомицина – NB50, NB54, NB74, NB84, NB124, NB156, NB157 и другие

[118, 119], а также новый перспективный аминогликозид TC007 [110, 120]. Сходное химическое устройство аминогликозидов иногда приводит к путанице (как это случилось с гентамицином B1 [121]). Тем не менее большинство других известных антибиотиков этого типа, по-видимому, бактериоспецифичны, что определяется особенностями в структуре спирали h44 ДЦ эукариот [14, 110, 122, 123]. Однако это не делает их безопасными для эукариотической клетки, поскольку они могут подавлять белковый синтез в митохондрии и вызывать серьёзные побочные эффекты (в первую очередь нефро- и ототоксичность), что ограничивает их использование в медицине в качестве антибактериальных препаратов [124, 125]. Как было сказано выше, при повышенных концентрациях некоторые аминогликозиды становятся ингибиторами транслокации.

Прочие механизмы нарушения элонгации. Уникальным механизмом действия обладает универсальный антибиотик пуромицин: он является молекулярным миметиком аминоацилированного CCA-конца тРНК и, попадая в A-сайт, вызывает преждевременную бесфакторную терминацию синтеза полипептида [7, 11]. Его действие настолько хорошо изучено, что реагенты на основе пуромицина с добавленными к нему флуорофорами и биотином широко применяются в современных методах визуализации и количественного анализа новосинтезируемых белков, таких как PUNCH-P, SUnSET, Puro-PLA, RiboLace и RPM, а также используются в мРНК-дисплее [126]. Обработка клеток пуромицином в сочетании с циклогексимидом приводит к накоплению рибосом на стартовых кодонах, что позволяет идентифицировать их методом рибосомного профайлинга [127]. С другой стороны, эффекты от сочетания разных антибиотиков с пуромицином зависят от соотношения их концентраций и не всегда предсказуемы, что может приводить к артефактам [128, 129]. Частично сходную с пуромицином структуру имеет упоминавшийся выше антибиотик A201A [13, 40], однако он не может являться акцептором пептидной связи и лишь ингибирует пептидилтрансферазную реакцию.

Среди ингибиторов бактериальной трансляции есть целый класс антибиотиков, связывающихся с большой субчастицей рибосомы в центре посадки трансляционных ГТФаз, называемом ГТФаза-активирующим центром (ГАЦ), и нарушающих работу этих факторов. Примерами таких веществ являются ортосомицины и тиопептиды (эвернимицин, тиострептон, микрококцин и другие), они нарушают аккомодацию трансляционных факторов на рибосоме [7]. Для эукариот же на данный момент известен лишь один ингибитор с предположительно таким же механизмом действия – это противомалярийный препарат мефлоквин (рисунок, e.2). Он связывается с рибосомным белком uL13 и участком ES13 28S рРНК в непосредственной близости от ГАЦ [130]. Хотя это место не идентично участку связывания ортосомицинов и тиопептидов, скорее всего, он действует аналогичным образом.

ГАЦ является мишенью для ингибиторов ещё одного типа – растительных, грибных и бактериальных токсинов, именуемых «рибосом-инактивирующими белками» и «риботоксинами», которые апуринизируют или расщепляют конкретные положения в сарцин-рициновой петле 28S рРНК [131, 132]. Однако поскольку это высокомолекулярные ингибиторы, их рассмотрение выходит за рамки данного обзора. Кроме того, работу трансляционных ГТФаз, связывающихся с ГАЦ, нарушают также вещества, взаимодействующие непосредственно с самими этими белками; их мы рассмотрим в одном из следующих разделов обзора.

Рибосом-направленные ингибиторы инициации трансляции. Необычный механизм действия имеет универсальный ингибитор эдеин (рисунок, i.6) [18]. Он связывается с 40S субчастицей в районе E-сайта [14], однако, в отличие от описанных выше пактамицина, эметина и подобных им ингибиторов транслокации, препятствует узнаванию стартового кодона при сканировании [133, 134]. Скорее всего, эдеин мешает связыванию или аккомодации инициаторной Met-тРНК$_i$ в P-сайте, как это было показано для бактерий [7]. Считается, что в адекватных концентрациях он не мешает элонгации, и поэтому его можно применять для анализа механизма инициации трансляции, хотя иногда эта точка зрения оспаривается [135]. Использование эдеина при изучении инициации трансляции затрудняет то, что в норме он не проникает в клетки млекопитающих [136].

Вещество, сокращённо именуемое MDMP, действует на завершающую стадию инициации трансляции – присоединение 60S субчастицы (рисунок, i.9), не препятствуя другим этапам трансляционного цикла [137–140]. Мишенью для него является, по-видимому, сама рибосома [141], однако детали его связывания и ингибирующего действия пока остаются загадкой.

Не исключено, что на этапе eIF5B-опосредованного присоединения 60S субчастицы может действовать и рассмотренный в одном из предыдущих разделов мефлоквин, поскольку место его связывания с рибосомой предполагает, что вещество может препятствовать связыва-

нию не только элонгационных факторов, но и этого фактора инициации (рисунок, i.7). По крайней мере, функционально сходные с ним тиопептиды ингибируют связывание IF2 (ортолога eIF5B) на аналогичном этапе инициации трансляции у бактерий [7, 8].

Совсем недавно в направленном скрининге была идентифицирована группа веществ, препятствующих взаимодействию 60S субчастицы с фактором инициации eIF6 (рисунок, i.8) – eIFsixty-1 (клофазимин), eIFsixty-4 и eIFsixty-6, второй из которых оказывал наиболее действенный эффект на трансляцию и рост клеток [142]. Фактор eIF6 участвует в подготовке новосинтезированных рибосом, поступивших из ядра, к вступлению в первый трансляционный раунд, но также, вероятно, может принимать участие и в трансляционных событиях [143]. К сожалению, из-за отсутствия структурных данных нельзя сделать вывод о том, является ли мишенью этих веществ 60S субчастица или же сам фактор.

Рибосомные ингибиторы, влияющие на терминацию. Потенциальную роль в терапии наследственных и онкологических заболеваний, связанных с нонсенс-мутациями в важных генах или онкосупрессорах, играют вещества, влияющие на терминацию трансляции. Однако специфичных ингибиторов этой стадии с хорошо охарактеризованным механизмом действия известно очень немного (рисунок, t.2). Описанный выше пептидилтрансферазный ингибитор бластицидин S, с некоторой специфичностью блокирующий терминацию в бактериях [45], в эукариотической системе всё-таки воздействует в первую очередь на стадию элонгации [46]. Другой антибиотик, апидаецин (продуцируемый насекомыми антимикробный пептид), связывается с бактериальной рибосомой в начале пептидного туннеля и останавливает её перед стоп-кодоном [144], однако про его активность в эукариотической системе пока ничего не известно. Существуют данные о специфичном влиянии на терминацию антиракового агента гиродазола (он же гиролин или RP 49532A), который взаимодействует с 60S субчастицей в районе E-сайта и препятствует высвобождению пептида в экспериментах *in vitro* [89, 145, 146]. Высокая токсичность помешала использовать его в качестве лекарства [147], и дальнейшее изучение этого ингибитора не проводилось.

Гораздо больше известно веществ, которые действуют не собственно на освобождение пептида, а на предыдущую стадию – узнавание стоп-кодона, индуцируя его сквозное прочтение (рисунок, t.1). Более 10% наследственных заболеваний связаны с наличием нонсенс-мутаций в важных генах, а многие случаи рака – с возникновением преждевременных стоп-кодонов в генах-супрессорах [148, 149]. Нонсенс-супрессорная терапия направлена на повышение частоты аберрантного встраивания аминокислоты вместо гидролиза пептидил-тРНК на стоп-кодоне [150, 151]. Эффективные и нетоксичные индукторы сквозного прочтения могли бы быть востребованы для лечения сразу многих наследственных и онкологических заболеваний.

Хорошо охарактеризованными ингибиторами этого класса являются уже рассмотренные выше аминогликозиды (в частности, G418, паромомицин и гентамицин X2): вызываемое ими снижение точности декодирования приводит заодно и к пониженной частоте узнавания стоп-кодонов [110, 111, 113, 115, 152]. Некоторые аминогликозиды (например, G418), будучи взятыми в определённых концентрациях, могут индуцировать сквозное прочтение, не приводя к серьёзному снижению общей точности белкового синтеза и сильным изменениям в экспрессии генов [113, 115, 117]. Много усилий направлено на разработку синтетических производных аминогликозидов, повышающих частоту сквозного прочтения, но обладающих невысокой токсичностью. Примером такого вещества является NB124 [114, 119].

Тем не менее полностью избежать побочных эффектов при применении аминогликозидов всё же не удаётся: долговременная терапия связана с рисками нефро- и ототоксичности [111, 153–155]. Поэтому большие усилия направлены на поиск индукторов сквозного прочтения неаминогликозидной природы. Наиболее известным таким веществом является аталурен (PTC124), на который возлагались большие надежды в терапии муковисцидоза и других наследственных заболеваний, вызываемых нонсенс-мутациями [156]. К сожалению, клинические испытания не дали желаемого эффекта [157, 158]. Более того, его активность в качестве индуктора сквозного прочтения была подвергнута сомнению, поскольку выяснилось, что вещество влияет также на стабильность репортерного белка [159]. Помимо аталурена, известен ещё целый ряд природных и синтетических индукторов сквозного прочтения неаминогликозидной природы с неизвестным пока механизмом действия – GJ071, GJ072, RTC13, RTC14, BZ16, амлексанокс и другие, найденные в высокопроизводительных биохимических скринингах [150, 160]. Аналогичное действие, вероятно, может вызывать вещество TCP-1109 [161, 162] – производное антибактериального дипептида негамицина; последний связывается с бактериальной 30S субчастицей неподалёку от ДЦ и вызывает ошибки

декодирования, нарушение элонгации и терминации (см. [163] и ссылки в ней). Эффект нонсенс-супрессии в эукариотической системе был показан также для доксорубицина [152].

Крайне любопытная находка, сделанная относительно недавно, состоит в том, что некоторые вещества усиливают действие аминогликозидов на терминацию. Так, фталимидное производное CDX5-1, а также уже упоминавшееся вещество мефлоквин (и ряд других производных хинина) на два порядка повышают эффективность сквозного прочтения, индуцируемого G418 [164, 165]. Это позволяет добиваться достаточного количества полноразмерного продукта при низких концентрациях аминогликозида, которые не вызывают серьёзных побочных эффектов.

Ингибиторы рибосомного рециклинга. Последняя стадия трансляционного цикла – рибосомный рециклинг, связанный с высвобождением рибосом после гидролиза полипептида на стоп-кодоне [166]. Факторы рибосомного рециклинга и механизмы, лежащие в его основе, различаются у бактерий и эукариот [167], а веществ, которые бы специфично действовали на эту стадию, пока обнаружено не было. Тем не менее в случае бактерий влияние на рециклинг оказывают, в частности, аминогликозиды [168], причём структурные основы этого эффекта [109] подразумевают возможность подобных воздействий и на эукариотическую рибосому. Действительно, было показано [169, 170], что паромомицин, неомицин и гигромицин препятствуют диссоциации дрожжевых рибосом после терминации (рисунок, г.1). Аналогичный эффект оказывают и ингибиторы транслокации – циклогексимид и лактимидомицин [169, 170]. Кроме того, некоторый эффект на диссоциацию субчастиц у дрожжей, как и у бактерий, могут иметь вещества, нарушающие цикл работы транслоказы eEF2, описанные в следующем разделе [169, 171]. Это вызывает некоторое удивление, поскольку сейчас считается, что участие транслоказы – это специфика бактериального, а не эукариотического типа рибосомного рециклинга [167]. Нельзя исключать, что некоторые из этих наблюдений связаны со специфической системой, использованной авторами для изучения рециклинга в дрожжах [169].

ИНГИБИТОРЫ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

В данном разделе мы опишем ингибиторы, мишенью и местом связывания которых являются трансляционные факторы (табл. 2). Это связывание может происходить как в растворе, так и на рибосоме во время трансляционного цикла – в этом случае вещества могут контактировать одновременно и с фактором, и с рибосомными компонентами, однако мы всё же решили рассматривать их отдельно.

Ингибиторы элонгационных факторов. Большая группа химически разнородных веществ, выделяемых, как правило, из морских организмов (как бактерий, так и эукариот), атакует фактор элонгации eEF1A [172, 173]. Они связываются с определённым местом на поверхности белка, модулируя динамику его конформационных изменений, в результате чего eEF1A лишается способности диссоциировать с рибосомы после гидролиза GTP (рисунок, е.2) и блокирует элонгацию. Непонятно, почему этот этап оказался особенно уязвимым для ингибиторов, но один и тот же механизм действия имеют малопохожие циклические депсипептиды из группы дидемнинов [174] (например, дидемнины A, B, C и M [175, 176], аплидин/плитидепсин [177], тамандарины A и B [178]), ансамицины (цитотриенин A [179] и сходные с ним триеномицины, хинотриериксины и ансатриенины A и B, по-другому называемые микотриенинами I и II [173, 180]), а также циклический пептид тернатин [173]. Более сложное устройство, но такой же механизм действия имеет и ещё одно макроциклическое соединение, нанноцистин A [181]. Все эти вещества являются, по сути, эукариот-направленными функциональными аналогами антибактериального антибиотика кирромицина, который стабилизирует комплекс аминоацил-тРНК с EF1α на рибосоме [7].

Отдельная группа ингибиторов проделывает аналогичный трюк с другим элонгационным фактором, транслоказой eEF2 (рисунок, е.7). Классическим примером является фунгицид сордарин и его многочисленные аналоги (мориниафунгин, GM193663, GR135402 и азасордарины), действующие на eEF2 некоторых грибов, но безопасные для человеческих клеток [182–185]. Связываясь с eEF2 [186, 187], они препятствуют его диссоциации с рибосомы и таким образом замораживают элонгационный комплекс в состоянии незавершённой транслокации [188]. Принцип действия сордаринов напоминает механизм работы известного противобактериального антибиотика фузидовой кислоты, хотя в деталях взаимодействия с фактором есть различия [188]. Сама фузидовая кислота в эукариотической системе, по-видимому, неспособна влиять на транслокацию, хотя может иметь некие неспецифичные эффекты [189].

Интересно, что для функционирования сордарина нужна уникальная АЭ-специфичная мо-

Таблица 2. Ингибиторы трансляционных факторов и АРСаз

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)	Мишень	Стадия трансляционного цикла	Механизм действия
Галлин (gallin)	ксантен	Б? А?, Э	40S? тРНК? мРНК?	И(Э)	ингибитор связывания мРНК и тРНК с рибосомой
Ауринтрикарбоновая кислота (aurintricarboxylic acid)	трифенилметан	Б, А, Э	40S? тРНК? мРНК?	И(Э)	ингибитор формирования комплекса eIF2–GTP–Met-тРНК$_i$ (и связывания мРНК и тРНК с рибосомой)
Пирокатехиновый фиолетовый (pyrochatechol violet)	– // –	Б? А?, Э	40S? тРНК? мРНК? 60S?	И(Э)	– // –
Галлеин (gallein)	ксантен, аналог флуоресцеина / галлина	Э?	40S? тРНК? мРНК?	И?	– // –
NSC119893	– // –	Э?	eIF2–GTP–Met-тРНК$_i$?	И*	– // –
NSC119889	– // –	Э?	eIF2–GTP–Met-тРНК$_i$?	И*	– // –
Шоудомицин (showdomycin)	аналог уридина	Б, А, Э	eIF2, eEF2?	И, Э	– // –, ингибитор eEF2?
Дидемнин B (didemnin B)	циклический пептид	Э	eEF1A	Э	удерживает eEF1A в комплексе с Аа-тРНК на рибосоме после гидролиза GTP
Аплидин/плитидипсин/дегидродидемнин B (aplidine/plitidipsin/dehydrodidemnin B)	– // –	Э	eEF1A	Э	– // –
Нанноцистин A (nannocystin A)	– // –	Э	eEF1A	Э	– // –
Цитотриенин A (cytotrienin A)	– // –	Э	eEF1A	Э	– // –
Тамандарин A, B (tamandarin A,B)	– // –	Э	eEF1A	Э	– // –
Ансатриенин A/микотриенин I (ansatrienin A/mycotrienin I)	циклический пептид, ансамицин	Э	eEF1A	Э	– // –
Ансатриенин B/микотриенин II (ansatrienin B/mycotrienin II)	– // –	Э	eEF1A?	Э?	– // –
Триеномицин A (trienomycin A)	– // –	Э	eEF1A?	Э	– // –
Моноеномицин (monoenomycin)	– // –	?	eEF1A?	Э?	– // – ?
Триеномицины J-L (trienomycins J-L)	– // –	?	eEF1A?	Э?	– // – ?

Продолжение таблицы 2

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)	Мишень	Стадия трансляционного цикла	Механизм действия
Триериксин (trierixin)	– // –	Э	eEF1A?	Э	– // –
Хинотриериксин (quinotrierixin)	– // –	Э	eEF1A?	Э	– // –
Тернатин (ternatin)	дитерпеновый алкалоид	Э	eEF1A	Э	– // –
Тозилфенилаланилхлорометан (tosylphenylalanylchloromethane)	хлорметил кетон	Б, А, Э?	eEF1A?	Э	– // –
Бувардин (bouvardin)	циклический пептид, группа бувардина	Э	eEF2	Э	блокирует диссоциацию eEF2 с рибосомы
SVC112	– // –	Э	eEF2?		– // – ?
RA-VII	– // –	Э	eEF2?	Э	– // –?
DDD107498	производное хинолина	Э*	eEF2	Э	– // –
Сордарин (sordarin)	циклический дитерпеновый гликозид, группа сордарина	Э*	eEF2	Э	– // –
GM193663	– // –	Э*	eEF2	Э	– // –
GR135402	– // –	Э*	eEF2	Э	– // –
Мориниафунгин (moriniafungin)	– // –	Э*	eEF2	Э	– // –
Дигидроармиллилоселлинат/DAO (dihydroarmillylorsellinate)	поликетид-сесквитерпен	Э	eEF2		– // –
Арнамиал (arnamial)	– // –	Э	eEF2		– // –
Фузидовая кислота (fusidic acid)	стероид	Б, А, (Э)	(eEF2)	Э	ингибитор транслокации? (вероятно, неспецифично)
Аллолауринтерол (allolaurinterol)	сесквитерпен	Э	eIF4A	И	ингибирует АТРазную активность eIF4A
Элизабатин А (elisabatin A)	– // –	Э	eIF4A	И	– // –
Сильвестрол (silvestrol)	флаваглин	Э	eIF4A	И	ингибирует хеликазную активность eIF4A
Патеамин А (pateamine A)	макродиолид	Э	eIF4A	И	нарушает связывание eIF4A с eIF4G
Гиппуристанол (hippuristanol)	стероид	Э	eIF4A	И	аллостерический ингибитор eIF4A
Рокагламиды (rocaglamides)	флаваглин	Э	eIF4A	И	ингибирует хеликазную активность eIF4A и связывание eIF4F с мРНК

Продолжение таблицы 2

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)	Мишень	Стадия трансляционного цикла	Механизм действия
Рибавирин (ribavirin)	аналог m^7G	Э	eIF4E?	И	возможно, в некоторых условиях может конкурировать с m^7G-кепом за связывание eIF4E?
4EGI-1		Э	eIF4E–eIF4G	И	связывается с eIF4E, препятствуя взаимодействию с eIF4G
4E1RCat		Э	eIF4E–eIF4G	И	– // –
4E2RCat		Э	eIF4E–eIF4G	И	– // –
Гефироновая кислота (gephyronic acid)	поликетид	Э	(eIF2)	И	связывается с eIF2 и влияет на его активность?
CM16	бета-карболин	Э	eIF1AX, eIF3	И	ингибирует eIF1AX и eIF3?
Охратоксин А (ochratoxin A)	изокумарин	Б, А, Э	Phe-тРНК-синтетаза	Э	ингибитор Phe-тРНК-синтетазы
Боррелидин (borrelidin)	поликетид	Б, А, Э	Thr-тРНК-синтетаза	Э	ингибитор Thr-тРНК-синтетазы
Реверомицин А (reveromycin A)	– // –	Э	Ile-тРНК-синтетаза	Э	ингибитор Ile-тРНК-синтетазы
Спирофунгин А (spirofungin A)	– // –	Э	Ile-тРНК-синтетаза	Э	– // –
Фураномицин (furanomycin)	аналог Ile	Б? А? Э	Ile-тРНК-синтетаза		– // –
Метионин сульфамид (methionine sulfamide)	аналог Met	Б, А, Э	Met-тРНК-синтетаза	Э	ингибитор Met-тРНК-синтетазы
Метионил аденилат (methionyl adenylate)	– // –	Б, А, Э	Met-тРНК-синтетаза	Э	– // –
Метионин гидроксамат 20 (methionine hydroxamate 20)	– // –	Б, А, Э	Met-тРНК-синтетаза	Э	– // –
Этионин (ethionine)	– // –	Б, А, Э	Met-тРНК-синтетаза	И, Э	– // –
Таваборол (AN2690, tavaborole)	оксаборол	Э	Leu-тРНК-синтетаза	Э	ингибитор Leu-тРНК-синтетазы
Гистидинол (histidinol)	аналог His	Б, А, Э	His-тРНК-синтетаза	Э	ингибитор His-тРНК-синтетазы и биосинтеза His
Фосмидозин (phosmidosine)	нуклеозидный амидофосфит	Э	Pro-тРНК-синтетаза?	Э	ингибитор Pro-тРНК-синтетазы
Фебрифугин (febrifugine)	хиназолиноновый алкалоид	?	Pro-тРНК-синтетаза	Э	– // –
Галофугинон (halofuginone)	хиназолиноновый алкалоид, аналог фебрифугина	?	Pro-тРНК-синтетаза	Э	– // –

Окончание таблицы 2

Название	Класс, группа веществ	Специфичность (Б, А, Э)	Мишень	Стадия трансляционного цикла	Механизм действия
Пурпуромицин (purpuromycin)	поликетид	Б, А, Э	тРНК	Э	связывает любые тРНК, препятствуя их аминоацилированию
GC7	аналог спермидина	Б, А, Э	DHPS/eIF5A	Э	ингибитор синтеза гипузина, необходимого для работы eIF5A
Семапимод/CNI1493 (semapimod)	анилид	Э	– // –	Э	– // –
Дезоксиспергуалин/гусперимус (deoxyspergualin/gusperimus)		Э	– // –	Э	– // –
DHSI-15		Э	– // –	Э	– // –
Циклопирокс/лопрокс (ciclopirox/loprox)	производное пиридона	Э	DOHH/eIF5A	Э	ингибитор синтеза гипузина, необходимого для работы eIF5A (хелатор железа)
Деферипрон (deferiprone)	– // –	Э	– // –	Э	– // –
Мимозин (mimosine)	– // –	Э	– // –	Э	– // –

Примечание. Буквенные коды и обозначения – как в табл. 1.

дификация eEF2 – дифтамид [190]. Эта же аминокислота является мишенью для большой группы бактериальных белковых токсинов (дифтерийного и других), которые инактивируют eEF2 путём ADF-рибозилирования дифтамида, однако поскольку белковые ингибиторы не являются предметом данного обзора, заинтересованному читателю можно порекомендовать ознакомиться с другими обзорами на эту тему [191].

Вопрос о наличии аналога сордарина, который бы действовал на клетки млекопитающих, пока остаётся открытым. Скорее всего, такой механизм действия можно приписать противоопухолевому препарату, циклическому пептиду бувардину и его производным: RA-VII, SVC112 и другим [192, 193]. Ранее сообщалось, что похожим образом может действовать пурпуромицин [194], однако впоследствии оказалось, что его эффекты связаны с ингибированием аминоацилирования (см. ниже). Зато недавно был открыт нетоксичный для клеток человека противомалярийный препарат DDD107498, мишенью которого является eEF2 малярийного плазмодия [195]. Интересно, что в его состав входит хинолиновый гетероцикл, как и в состав вышеописанного противомалярийного препарата мефлоквина. Не исключено, что вещества наподобие хинина, применяемые для лечения малярии, все так или иначе направлены на нарушение взаимодействия факторов элонгации с рибосомой [130].

Мишенью для ингибиторов может служить также ещё один фактор элонгации (ранее ошибочно считавшийся фактором инициации) – eIF5A, точнее, уникальная модификация одного из его аминокислотных остатков, гипузина, необходимая для его работы [196]. Вещества, блокирующие разные стадии превращения консервативного остатка лизина eIF5A в гипузин, приводят к накоплению в клетке неактивного фактора. К таким ингибиторам относятся GC7, семапимод (CNI1493), дезоксиспергуалин (гусперимус), DHSI15, а также циклопирокс, деферипрон и мимозин (см. обзор в [196]). Однако эти вещества не являются высокоспецифичными: некоторые из них влияют на работу других ферментов, участвующих в метаболизме и транспорте полиаминов или других молекул, а последние три и вовсе являются хелаторами железа. Кстати, для мимозина ранее в качестве вторичной мишени был идентифицирован и другой трансляционный фактор – eIF3: это вещество приводит к специфичному снижению экспрессии гена одной из его субъединиц, eIF3a [197].

Ингибиторы инициаторных факторов. В отличие от относительно консервативных элонгаци-

онных факторов, многие компоненты инициаторного аппарата эукариот появились в эволюции с возникновением сканирования и являются эукариот-специфичными. В первую очередь это относится к факторам инициации группы eIF4, которые помогают мРНК связаться с рибосомой и участвуют в сканировании [1]. Небольшой кеп-связывающий белок eIF4E «заякоривает» трёхсубъединичный комплекс eIF4F, компонентом которого он является, на m^7G-кепированном 5′-конце клеточных мРНК, а его партнёр, мРНК-связывающий фактор eIF4G, выполняет роль платформы для посадки на мРНК АТР-зависимой РНК-хеликазы eIF4A и служит «мостиком» между мРНК и факторами, входящими в состав рибосомного 43S преинициаторного комплекса [1].

В направленном высокопроизводительном скрининге [198] было найдено вещество 4EGI-1, которое связывается с белком eIF4E и аллостерически нарушает его ассоциацию с eIF4G (рисунок, i.3), одновременно усиливая его взаимодействие с ингибитором 4E-BP1 [199, 200]. Тем самым 4EGI-1 подавляет кеп-зависимую трансляцию мРНК, не влияя на работу транскриптов, использующих неканонические механизмы инициации трансляции (например, вирусных мРНК с участками внутреннего связывания рибосомы (IRES-элементами) или клеточных мРНК с кеп-независимыми трансляционными энхансерами (CITE-элементами) [201]). В другом скрининге были идентифицированы ещё два вещества с аналогичным механизмом действия, 4E1RCat [202] и 4E2RCat [203], последнее из которых показало мощную противовирусную активность, подавляя развитие коронавирусов.

Есть предположение, что сходным образом могут действовать некоторые сердечные гликозиды – например, уабаин [204]. Интересно, что транскрипционный паттерн клеток, обработанных кардиогликозидами, сильно напоминает картину, вызываемую классическими ингибиторами элонгации (циклогексимидом, анизомицином, эметином и др.) [205], и в работе Perne et al. [206] было показано угнетение белкового синтеза этими веществами. Однако, скорее всего, речь здесь идёт всё же о вторичных или временных эффектах, поскольку сходство транскрипционных паттернов, ярко выраженное на 6-м часу обработки, к 24 часам исчезает [205]. Возможно, они ингибируют сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR [207], о котором речь пойдёт ниже, или фактор eIF4A [208]. Однако в опытах по прямому влиянию на трансляцию репортерных мРНК в бесклеточной системе из клеток млекопитающих сердечные гликозиды не показали значимой ингибирующей активности (Лашкевич, Дмитриев, персональное сообщение).

Взаимодействие eIF4E с m^7G-кепом на 5′-конце мРНК также очень важно. В работе Kentsis et al. [209] было заявлено, что это взаимодействие можно нарушить конкурентным ингибитором (рисунок, i.4) – противовирусным препаратом рибавирином (и его трифосфорилированной формой), напоминающим по своей структуре m^7G-кеп. Однако это утверждение было оспорено сразу двумя группами [210, 211], хотя авторы оригинальной работы остались при своём мнении [212]. Позднее было также показано влияние рибавирина на сигнальный путь Akt [213], которое, возможно, и объясняет его эффекты.

Благодаря работам группы Pelletier et al. был открыт целый ряд новых ингибиторов, мишенью которых является другой компонент комплекса eIF4F – РНК-хеликаза eIF4A [214, 215]. Так, стероид гиппуристанол связывается и аллостерически ингибирует eIF4A (рисунок, i.5) [216], а патеамин А препятствует её взаимодействию с eIF4G (рисунок, i.2), усиливая связывание eIF4A с мРНК [217, 218]. Несколько хуже охарактеризован механизм действия рокаглатов, в том числе Roc-A, сильвестрола и других веществ из группы флаваглинов, также приводящих к нарушению работы eIF4A (рисунок, i.5) [219–221]. С помощью рибосомного профайлинга было показано, что некоторые из них имеют специфичность к нуклеотидной последовательности 5′-нетранслируемой области, на которой происходит остановка сканирования из-за угнетения функции eIF4A (см. обсуждение в [221]), а последнее исследование выявило двойное действие этих ингибиторов: на стадию посадки фактора eIF4F и инициаторного комплекса на 5′-кеп, а также на последующее рибосомное сканирование [221]. Для некоторых из этих ингибиторов eIF4A получены и охарактеризованы многочисленные производные с целью их использования в противоопухолевой терапии [221, 222]. Недавно был проведён ещё один скрининг, в котором были выявлены два новых высокоспецифичных АТР-конкурентных ингибитора eIF4A – элизабатин А и аллолауринтерол [223]. Известны и другие ингибиторы трансляционных РНК-хеликаз (не только eIF4A, но и DDX3) – например, вещества нуклеозидной природы, такие как гиперицин, однако они действуют менее специфично [214].

Универсальными ингибиторами, действующими преимущественно на инициацию трансляции и широко использовавшимися на заре

изучения механизмов биосинтеза белка, являются ауринтрикарбоновая кислота (АТА) и сходные с ней трифенилметановые и ксантеновые красители: галлин, пирокатехиновый фиолетовый и ряд других [18, 224, 225]. Однако специфичность действия этих соединений вызывает вопросы, поскольку в зависимости от концентрации они могут ингибировать разные стадии белкового синтеза (см. обсуждение в [10]). АТА и подобные ей соединения, по всей вероятности, являются умеренно специфичными разобщителями РНК-белковых контактов [226, 227], и их действие на фактор-опосредованное и бесфакторное связывание тРНК с рибосомой *in vitro* [228] вызвано нарушением этих взаимодействий (рисунок, i.1). Кроме того, использование данных веществ затрудняет то, что они не проникают в клетки млекопитающих [229]. По этой причине в наши дни они почти не используются для изучения эукариотической трансляции.

Тем не менее в 2004 году при поиске новых трансляционных ингибиторов было обнаружено несколько похожих соединений (производных галлеина и флуоресцеина), которые показали интересное мРНК-специфичное воздействие на трансляцию репортерных транскриптов [230]. Их добавление в бесклеточную систему подавляло кеп-зависимую трансляцию, но почти не сказывалось на трансляции, направляемой IRES-элементом вируса гепатита С (HCV). Этот IRES, помимо прочих своих особенностей, известен тем, что в определённых условиях способен обеспечивать eIF2-независимую инициацию трансляции [231, 232]. Более подробное изучение веществ NSC 119889 и NSC 119893 (последнее из которых оказалось способно проникать в культивируемые клетки млекопитающих) показало, что они препятствуют связыванию инициаторной Met-тРНК$_i$ с eIF2 (рисунок, i.1) и тем самым блокируют образование 43S преинициаторного комплекса [232], обязательного интермедиата канонической инициации трансляции.

Некоторые другие трансляционные факторы (например, eIF1AX и eIF3 [197, 233]) также были идентифицированы в качестве мишеней для низкомолекулярных ингибиторов, но пока эта тема недостаточно изучена. Кроме того, фактор-опосредованные функции можно заблокировать также негидролизуемыми аналогами рибонуклеозидтрифосфатов (инициацию, элонгацию и терминацию трансляции – аналогами GTP (например, GMPPNP или GMPPCP), а инициацию и рециклинг – ещё и аналогами ATP). Однако эти ингибиторы, разумеется, не являются специфичными и, кроме того, как правило, не проникают в клетку [229].

ИНГИБИТОРЫ АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗ

Помимо рибосом- и фактор-направленных ингибиторов, высокоспецифичное влияние на биосинтез белка могут оказывать вещества, блокирующие вспомогательные компоненты трансляционной машинерии – в первую очередь ингибиторы аминоацил-тРНК-синтетаз (АРСаз), примеры которых также приведены в табл. 2 и на рисунке, e.1. Сульфамиды, гидроксаматы и прочие производные аминокислот и пептидов, а также эфиры и гидроксаматы аминоацил-аденилатов ингибируют синтез соответствующих аминоацил-тРНК. Например, L-метионинол, метионилсульфамид, L-метионил-гидроксамат и разные варианты метионил-аденилатов специфично подавляют синтез Met-тРНК [234, 235], а 6-фтортриптофан, антагонист Trp, ингибирует реакцию активации Trp при синтезе аминоациладенилата [236]. Работ, в которых описаны такие производные, существует великое множество [10], и их число быстро растёт благодаря современным методам компьютерного дизайна веществ [237–239]. В редких случаях аналоги аминокислот (например, этионин – S-этиловый аналог метионина) не только ингибируют АРСазы, но и могут встраиваться в белки, быстро приводя к пагубным для клетки последствиям [240].

Большинство вышеописанных веществ являются универсальными ингибиторами биосинтеза белка и обладают свойством свободно проникать в клетки эукариот, однако из-за сходства с аминокислотами они могут влиять и на другие процессы, а их эффективные концентрации обычно находятся в относительно высоком (миллимолярном) диапазоне. Большей аффинностью к мишеням обладают высокоспецифичные ингибиторы АРСаз, вырабатываемые некоторыми организмами. Так, боррелидин, производимый некоторыми морскими бактериями, является высокоспецифичным ингибитором треонил-тРНК-синтетазы [241], охратоксин А из плесневых грибов поражает фенилаланил-тРНК-синтетазу [242], фебрифугин и галофугинон ингибируют пролиловую [243, 244], а тавборол – лейциловую АРСазы [245]. Спирофунгин А [246] и реверомицин А [247, 248] действуют на изолейцил-тРНК синтетазу, причём последний в некоторых тестах показывает специфичность по отношению к определённому типу клеток [249]. Немного особняком стоит необычный ингибитор пурпуромицин, способный связываться с любой тРНК и препятствовать её аминоацилированию; при этом на связывание аминоацилированных тРНК с факторами элон-

гации, рибосомой и другими трансляционными компонентами он никак не влияет [250].

Многие ингибиторы АРСаз имеют важное медицинское значение, поскольку обладают иммуносупрессорным эффектом, применяются в антимикробной, противоопухолевой и антипаразитарной терапии [239, 251]. Их действие на клетку обычно опосредовано не только угнетением белкового синтеза, но и запуском особого типа стрессового ответа [252], вызываемого накоплением в цитоплазме деацилированных тРНК и столкновениями транслирующих рибосом (см. ниже).

ИНГИБИТОРЫ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, СВЯЗАННЫХ С РЕГУЛЯЦИЕЙ ТРАНСЛЯЦИИ

Как и любой другой сложный процесс в клетке, биосинтез белка тонко регулируется на разных уровнях. В частности, у эукариот существует несколько сигнальных каскадов, заканчивающихся специализированными ферментами, модифицирующими трансляционные компоненты [253, 254]. Эти сигнальные каскады могли бы стать темой для отдельного обзора, поэтому мы не будем останавливаться на них подробно – однако было бы неправильно не упомянуть хотя бы некоторые из наиболее важных мишеней – компонентов таких каскадов – и направленных на них ингибиторов (табл. 3 и рисунок).

Ингибиторы киназы mTOR и сигнального каскада PI3K/Akt/mTOR. Крайне важным сигнальным путём является регуляторный каскад PI3K/Akt/mTOR, интегрирующий сигналы от инсулина, ряда ростовых факторов и информацию о доступности аминокислот [255, 256]. Одна из непосредственных мишеней киназы mTOR – уже упоминавшийся белок-ингибитор 4E-BP1, который при фосфорилировании становится неактивным и не мешает кеп-связывающему фактору eIF4E выполнять свою функцию [256]. Но если mTOR инактивирована, 4E-BP1 вытесняет eIF4G из комплекса с eIF4E, в результате трансляция в клетке в целом становится гораздо менее интенсивной, а особый класс мРНК, содержащих на 5′-конце олигопиримидиновый тракт (5′-TOP), и вовсе почти перестаёт транслироваться [201, 255]. 5′-TOP мРНК кодируют в основном компоненты трансляционного аппарата (рибосомные белки, факторы трансляции и так далее) [257, 258], поэтому их трансляция особенно важна для активно делящейся и метаболизирующей клетки – например, раковой [259]. Активность этого пути также сильно меняется с возрастом [260], а его отдельные компоненты тесно связаны с продолжительностью жизни [261]. К мишеням mTOR также относятся киназы S6K1/2, фосфорилирующие рибосомный белок eS6 (RPS6), фактор инициации трансляции eIF4B, белок PDCD4 (ингибитор eIF4A), а также – опосредованно – eEF2 [253, 254]. Всё это делает mTOR привлекательной мишенью для новых клинически значимых ингибиторов [259]. На данный момент таких ингибиторов найдено уже довольно много (наиболее известные из них приведены в табл. 3). Их можно разделить на два типа: прямые ATP-конкурентные ингибиторы активного центра киназы mTOR (рисунок, s.6) и аллостерические, действующие опосредованно через белок FKBP12 (рисунок, s.7) – компонент киназного комплекса mTORC1 (мишенями этого комплекса как раз и являются вышеперечисленные трансляционные факторы). К первому типу относятся такие широко используемые ингибиторы, как торин 1, торин 2, INK128, AZD-8055, OSI-027, WYE-132, Ku0063794, PP242 и другие [255, 262], ко второму – природный макролид рапамицин (сиролимус) и его синтетические аналоги, именуемые «рапалогами», – эверолимус, темсиролимус и ридафоролимус [255, 259]. Рапалоги давно и успешно применяются для иммуносупрессии при пересадке органов, а также в противораковой терапии. В последнее время всё больше внимания уделяется ингибиторам mTOR как перспективным геропротекторам, поскольку на многих животных моделях была показана их способность увеличивать продолжительность жизни [261].

Некоторые вещества, хорошо зарекомендовавшие себя в качестве ингибиторов кеп-зависимой трансляции, направлены не на саму киназу mTOR, а на вышерасположенные компоненты каскада PI3K/Akt/mTOR (рисунок, s.5). С продвижением вверх по каскаду, разумеется, увеличивается и спектр воздействия данных веществ, а специфичность эффектов уменьшается. Тем не менее довольно часто для подавления кеп-зависимой трансляции используют ингибиторы PI3K – например, вортманин или LY294002, тем более что киназные домены PI3K и mTOR относятся к одному семейству и часто подвержены действию одних и тех же ингибиторов [263]. В проведённом недавно поиске веществ, направленных на избирательное подавление трансляции 5′-TOP мРНК [264], в число наилучших вошли ингибиторы каждого из компонентов каскада, а также, весьма неожиданно, киназы GCN2, о которой будет сказано ниже. Возможно, что с той или иной специфичностью ингибиторами пути PI3K/Akt/mTOR являются также сердечные гликозиды [207].

Тем не менее нужно помнить, что у киназы mTOR насчитывается не один десяток мишеней, многие из которых не имеют никакого отношения к трансляции. Поэтому о высокоточном влиянии её ингибиторов на белковый синтез речь идти не может. То же самое можно сказать и о киназах MAPK-каскадов (Ras/ERK/RSK и p38MAPK/Mnk1/2), частично пересекающихся с путём PI3K/Akt/mTOR [253, 254]; хотя их мишенями служат в том числе eIF4E, eIF4B, eEF2 и другие общие факторы трансляции, однозначного мнения о том, как они влияют на биосинтез белка в целом, пока нет, а их воздействие на клетку носит широкий характер.

Модуляторы фосфорилирования eIF2. Куда более специфичное действие имеют киназы фактора инициации eIF2, которых у млекопитающих насчитывается четыре: GCN2, HRI, PERK и PKR [265, 266]. eIF2 доставляет инициаторную Met-тРНК$_i$ в P-сайт 40S субчастицы и обеспечивает сканирование [5], он является ключевым фактором, необходимым всем эукариотическим мРНК за исключением тех редчайших случаев, когда стартовый кодон мРНК оказывается в P-сайте рибосомы без сканирования [267]. Фосфорилирование α-субъединицы eIF2 нарушает его диссоциацию из комплекса с eIF2B фактором обмена GDP на GTP, в результате eIF2 выводится из игры. До недавних пор считалось, что для каждой из упомянутых киназ фактор eIF2 – единственная мишень; сейчас известно, что это не совсем так [265, 268], однако нет никаких сомнений в том, что основное их назначение – именно регуляция трансляции. Поэтому вещества, модулирующие работу этих киназ, нельзя не рассмотреть в данном разделе.

BTdCPU и другие производные N,N′-диарилмочевины являются специфическими активаторами киназы HRI (рисунок, s.2) и рассматриваются как перспективные антираковые препараты [269]. CCT020312 и MK-28 – фармакологические активаторы PERK (рисунок, s.1) с потенциалом применения в лечении нейропатий [270, 271]. Вопрос о специфичных активаторах киназы GCN2 (рисунок, s.3) пока недостаточно изучен, однако в недавнем скрининге были определены два кандидата – низкомолекулярные вещества дабрафениб и MK1775 [264]. Интересно, что их действие на клетку приводит к подавлению трансляции 5′-TOP мРНК и напоминает таким образом действие ингибиторов mTOR. Механизм этого не был установлен, однако в более раннем исследовании была показана связь GCN2 и 5′-TOP мРНК, опосредованная белками TIA-1/TIAR [272].

Резко повысить уровень фосфорилирования eIF2 можно также путём нарушения работы специфичных для eIF2 комплексов фосфатазы PP1. Так, салубринал (и его водорастворимое производное Sal003) инактивирует стресс-индуцируемый комплекс GADD34/PP1 и конститутивно активный комплекс CReP/PP1 (рисунок, s.4), вызывая угнетение биосинтеза белка в клетке [273, 274]. Сообщалось также о фосфорилировании eIF2 при обработке клеток окадаиковой кислотой, ингибитором фосфатазы PP2A [275], однако этот эффект, возможно, носит неспецифичный характер, поскольку eIF2α считается мишенью PP1, а не PP2A [276]. Тем не менее обе фосфатазы играют большую роль в регуляции трансляционных факторов [277], поэтому они представляют собой важные мишени для низкомолекулярных веществ.

Что касается ингибиторов, а не активаторов четырёх киназ eIF2, которые также известны в большом количестве, то в обычных условиях они, как правило, слабо влияют на эффективность синтеза белка в клетке, но способны препятствовать падению уровня трансляции при соответствующем стрессе. Поскольку временный трансляционный блок является важной частью антистрессового ответа на многие воздействия, его нарушение зачастую имеет пагубные последствия для стрессированной клетки. Однако рассмотрение этих специфических эффектов, имеющих значение для антивирусной терапии, при лечении неврологических расстройств и в онкологии для усиления действия хемиотерапевтических препаратов выходит за рамки данного обзора; интересующимся этой темой можно порекомендовать обзор Joshi et al. [268].

Тем не менее одно вещество с очень любопытным механизмом действия хотелось бы упомянуть. Речь о малой молекуле *транс*-ISRIB [278], которая способна связываться с eIF2B и до определённых пределов поддерживать GDP/GTP-обменивающую активность по отношению к eIF2 при его фосфорилировании [279]. Поскольку усиление трансляции в нейронах головного мозга может положительно влиять на консолидацию кратковременной памяти в долговременную, ISRIB способен улучшать память и когнитивные способности животных [278].

Говоря об ингибирующем эффекте фосфорилирования eIF2, нельзя не упомянуть несколько веществ, которые очень часто используются для его опосредованной индукции. К таким веществам относятся туникамицин (ингибитор гликозилирования белков, вызывающий стресс эндоплазматического ретикулума), тапсигаргин (индуктор высвобождения ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо) и дитиотреитол (нарушающий тиольный обмен, что запускает стрессовый каскад ответа на несвернутые белки, известный

Таблица 3. Ингибиторы основных сигнальных путей, регулирующих биосинтез белка в клетках эукариот

Название	Класс, группа веществ	Мишень	Стадия трансляционного цикла	Механизм действия
Рапамицин (rapamycin)	макролид, группа рапамицина	mTORC1 (FKBP12)	И (Э)	аллостерический ингибитор mTOR; активация 4E-BP1 и подавление кеп-зависимой трансляции, в первую очередь 5′-TOP мРНК
Эверолимус (everolimus)	макролид, группа рапамицина (рапалог)	mTORC1 (FKBP12)	И (Э)	– // –
Темсиролимус (temsirolimus)	– // –	mTORC1 (FKBP12)	И (Э)	– // –
Ридафоролимус (ridaforolimus)	– // –	mTORC1 (FKBP12)	И (Э)	– // –
Торин 1 (torin 1)	пиридинонехинолин	mTOR	И (Э)	ATP-конкурентный ингибитор mTOR; активация 4E-BP1 и подавление кеп-зависимой трансляции, в первую очередь 5′-TOP мРНК
Торин 2 (torin 2)	– // –	mTOR	И (Э)	– // –
Торкиниб/PP242 (torkinib)	пиразолопиримидин	mTOR	И (Э)	– // –
Сапанисертиб/MLN0128/INK128/TAK-228 (sapanisertib)	бензоксазол	mTOR	И (Э)	– // –
Вистусертиб/AZD2014 (vistusertib)	фенилпиридин, группа вистусертиба	mTOR	И (Э)	– // –
AZD8055	– // –	mTOR	И (Э)	– // –
Дактолисиб/NVP-BEZ235 (dactolisib)	фенилхинолин	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Вокталисиб/SAR245409/XL765 (voxtalisib)	пиразолилпиридин	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Самотосилиб/LY3023414 (samotosilib)	имидазохинолин	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Омипалисиб/GSK2126458 (omipalisib)	хинолин	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Вортманин (wortmannin)	стероид	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
LY294002	производное морфолина	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Бимиралисиб/PQR309 (bimiralisib)	пиридинамин	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Гедатолисиб/PKI-587/PF-05212384 (gedatolisib)	бензоидпиперидин	PI3K/mTOR	И (Э)	– // –
Адавосертиб/MK1775 (adavosertib)	пиперазин	GCN2?	И	активатор GCN2? приводит к подавлению трансляции 5′-TOP мРНК
Дабрафениб (dabrafenib)	сульфанилид	GCN2?	И	– // –
BTdCPU	N,N′-диарилмочевина	HRI	И	активатор HRI, приводит к фосфорилированию и инактивации eIF2

Окончание таблицы 3

Название	Класс, группа веществ	Мишень	Стадия трансляционного цикла	Механизм действия
CCT020312	хинолин	PERK	И	активатор PERK, приводит к фосфорилированию и инактивации eIF2
MK-28	метиламипентанамид	PERK	И	– // –
Салубринал (salubrinal)	хинолин, группа салубринала	GADD34/PP1?, CReP/PP1?	И	ингибитор eIF2-специфичных комплексов фосфатазы PP1 (GADD34/PP1, CReP/PP1), приводит к инактивации eIF2
Sal003	– // –	GADD34/PP1?, CReP/PP1?	И	– // –
Окадаиковая кислота (okadaic acid)	поликетиное производное C_{38}-жирной кислоты	PP2A	И	ингибитор фосфатазы PP2A, приводит к фосфорилированию и инактивации eIF2
ISRIB	циклогексилацемид	eIF2B	И	модулятор активности eIF2B, препятствует подавлению трансляции
Мириапорон 3/4 (myriaporone 3/4)	поликетид, аналог теданолида (см. табл. 1)	eEF2K?	Э	индуцирует фосфорилирование и инактивацию eEF2
Нелфинавир/вирацепт/1UN (nelfinavir/viracept)		eEF2K?	Э	– // –
NH125	иодид метилимидазолия	eEF2K?	Э	– // –
A-484954	пиримидин-6-карбоксамид	eEF2K	Э	ингибитор eEF2K, препятствует подавлению трансляции

Примечание. Буквенные коды и обозначения – как в табл. 1.

как UPR) – эти вещества вызывают опосредованную активацию PERK. Широко используются арсенит натрия (также, по-видимому, действующий через SH-группы некоторых белков, но более избирательно, что приводит к активации HRI); неспецифичные окислители типа перекиси водорода (вероятно, тоже посредством HRI); длинная двухцепочечная РНК (активатор PKR); некоторые из уже упоминавшихся аналогов аминокислот – ингибиторов АРСаз (активирующие GCN2). Фосфорилирование eIF2 также индуцируют блокаторы дыхательной цепи митохондрий, гликолиза или АТР-синтазы (миксотиазол, 2-дезоксиглюкоза, олигомицин) и прочие ингибиторы энергетики и метаболизма. Однако мы не станем их подробно рассматривать, поскольку их действие неспецифично, а ингибирование трансляции является лишь одной из ветвей многопланового интегрированного стрессового ответа (ISR), который клетка разворачивает при подобных воздействиях [265, 266].

Индукторы фосфорилирования eEF2. Ингибирующему фосфорилированию подвержен также фактор элонгации eEF2. Его активность регулируют, вероятно, несколько киназ, но основной является специализированная киназа eEF2K. Будучи мишенью S6K и mTOR, она находится под негативным контролем каскада PI3K/Akt/mTOR: eEF2K активируется, а eEF2 частично теряет активность, когда этот путь подавлен [253]. Ингибиторы eEF2K не оказывают заметного воздействия на клетки [280], в то время как активаторы могут существенно снижать эффективность трансляции (рисунок, s.8). Например, поликетид мириапорон 3/4, напоминающий описанные выше рибосомные ингибиторы теданолид и 13-дезокситеданолид [90], индуцирует фосфорилирование eEF2 [92] и таким образом негативно воздействует на трансляцию [91]. Такой же эффект имеют антивирусный препарат нелфинавир [281] и вещество NH125 (ранее ошибочно считавшееся ингибитором eEF2K),

хотя в последнем случае связь эффекта с киназой не так очевидна [269, 282]. Модуляторы киназы eEF2K привлекают всё большее внимание исследователей в связи с её ролью в развитии депрессии, эпилепсии и нейродегенеративных заболеваний [283].

В контексте фосфорилирования eEF2 стоит упомянуть ещё одну киназу, активно вовлечённую в регуляцию биосинтеза белка, – AMPK. Она является сенсором дефицита энергии в клетке и при активации способствует снижению скорости элонгации путём передачи сигнала на eEF2K и фосфорилирования eEF2 [253]. Существует множество низкомолекулярных веществ, активирующих AMPK (рисунок, s.9) как опосредованно, путём истощения ATP (например, 2-дезоксиглюкоза, олигомицин и антидиабетический препарат метформин), так и напрямую (A-769622, бензимидазоловое производное «991» и, наверное, самый известный активатор AMPK – AICAR, используемый недобросовестными спортсменами в качестве допинга [284]). Все эти вещества индуцируют фосфорилирование eEF2, снижая эффективность трансляции [285]. Конечно, как и в случае с каскадом PI3K/Akt/mTOR (с которым у этого пути есть «пересекающиеся мишени»), действие активаторов AMPK на клетку носит широкий характер и не ограничивается подавлением трансляции [254].

РИБОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ДРУГИЕ ВИДЫ СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ, СВЯЗАННЫХ С ТРАНСЛЯЦИЕЙ

Говоря об эффектах трансляционных ингибиторов, невозможно не коснуться явлений, происходящих в эукариотической клетке в ответ на полную или частичную остановку белкового синтеза. В клетках эукариот существует несколько специальных механизмов, связанных с отслеживанием общего состояния биосинтеза белка: доступности аминокислот, нарушений котрансляционного фолдинга, адресации продуктов и так далее, а также с контролем качества трансляции отдельных транскриптов каждой рибосомой [6, 286]. В конце прошлого века стало известно, что под действием анизомицина и некоторых других ингибиторов элонгации в клетке запускается особый вид клеточного ответа, который был назван риботоксическим стрессом [287]. Интересно, что при одной и той же степени подавления синтеза одни ингибиторы (анизомицин, дезоксиниваленол) вызывали резкую активацию сигнального пути JNK/p38MAPK, что приводило к разрезанию pPHK и уходу клетки в апоптоз, в то время как другие (например, пактамицин) были начисто лишены такой способности [287–290]. Дальнейшие исследования показали, что иногда даже химически близкие вещества, имеющие одинаковый механизм действия, могут принципиально отличаться по этому параметру. Например, близкое производное того же анизомицина, диацетиланизомицин, не вызывает активации стрессового каскада [288], а разные представители трихотециновых микотоксинов, различающиеся лишь боковыми радикалами, сильно разнятся по этому параметру [288, 291, 292], хотя все они, как было описано выше, относятся к ингибиторам ПТЦ. Теопедерин, оннамид A и 13-дезокситеданолид связываются с другим местом на рибосоме и ингибируют транслокацию, однако активируют риботоксический стресс, аналогичный анизомициновому [86, 293]. Циклогексимид же является относительно слабым индуктором стресса [287, 294], в то время как другой глутаримид, лактимидомицин, вызывает сильную активацию p38MAPK [294]. Риботоксический стресс вызывает и упоминавшийся выше цитотриенин A, хотя его мишень – фактор eEF1A [295], а также некоторые аминогликозиды, известная ототоксичность которых может быть связана, в том числе, именно с индукцией этого стресса [296].

До недавнего времени механизм запуска риботоксического стресса представлял загадку, хотя промежуточные компоненты каскада – киназы JNK и p38MAPK – были идентифицированы ещё в первой работе по этой теме [287], а позднее кандидатами в посредники или первичные индукторы назывались киназы PKR и HCK [287–290]. Недавно исследователи обратили внимание на то, что некоторые ингибиторы элонгации, запускающие риботоксический стрессовый ответ, перестают быть индукторами при увеличении концентрации [67]. Это навело на мысль, что в основе данного явления лежит активация специфических сигнальных каскадов двумя или тремя столкнувшимися рибосомами: в условиях, когда элонгация частично блокируется каким-либо антибиотиком, такие случаи резко учащаются, что приводит к запуску генерализованного клеточного ответа, в то время как при одновременной остановке всех рибосом такие столкновения становятся невозможны. Данная гипотеза блестяще подтвердилась в недавнем исследовании, проведённом группой Green [67]. Авторам удалось показать, что детекция столкнувшихся рибосом лежит в основе запуска трёх разных молекулярных механизмов, ранее казавшихся независимыми. В случае единичных событий сталкивания срабатывают механизмы рибосомного контроля качества, RQC [6, 286], разбирающие конкретный «застряв-

ший» элонгационный рибосомный комплекс без последствий для клетки в целом; если таких событий больше (что наблюдается, например при недостатке аминокислот), то связывающиеся со столкнувшимися рибосомами белки GCN1, GCN20 и MAP3K-киназа ZAK активируют киназу GCN2, и та фосфорилирует eIF2 (см. выше); при резко возрастающем числе таких событий (например, при обработке антибиотиком или облучении ультрафиолетом) связавшаяся с рибосомами ZAK активирует сигнальный каскад JNK/p38MAPK, включая риботоксический стрессовый ответ [67, 294]. Действительно, давно известно, что риботоксический стресс можно частично подавить низкомолекулярными ингибиторами DHP-2, сорафенибом и нилотинибом, мишенью которых является ZAK [297–299]. Это открытие, вероятно, поможет также объяснить недавнее наблюдение, что реакция клетки на ингибиторы APCаз (см. выше) принципиально отличается от изменений, вызываемых простым аминокислотным голоданием [252]: ведь доступность аминокислот «вычисляется» каскадом взаимодействий с участием киназы mTOR [300] и развивается по одному сценарию (см. выше), в то время как ответ на деацилированную тРНК и участившиеся столкновения рибосом использует другие сигнальные пути, включая активацию GCN2 и/или каскада стрессовых MAPK-киназ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биосинтез белка – один из главных метаболических процессов, жизненно необходимый для поддержания всех функций организма. В активно пролиферирующих клетках на него расходуется существенная часть энергии, а нарушение трансляции приводит к неизбежной остановке деления и клеточной смерти. Неудивительно, что биосинтез белка является «ахиллесовой пятой» опухолевых клеток и активно размножающихся в клетке вирусов [136, 203, 259, 301, 302]. Разработка методов специфичного воздействия на биосинтез белка с помощью низкомолекулярных ингибиторов имеет большое значение для борьбы с раком, в иммуносупрессорной терапии, лечении наследственных, вирусных и грибковых заболеваний, в неврологии, паразитологии и гериатрии, в решении задач продления жизни, а также в сельском хозяйстве, ветеринарии и других областях [8, 27, 132, 148, 151, 155, 214, 259, 261, 301, 302]. Тем не менее в медицине их использование пока ограничено из-за побочных эффектов, вызываемых цитотоксичностью этих препаратов. Однако ускоренное развитие технологий высокопроизводительного скрининга [303], а также машинного обучения [304] и компьютерного моделирования в сочетании с современными методами структурного анализа и химического синтеза [84, 237–239] позволяет надеяться на быстрый прогресс в разработке новых производных с усовершенствованными терапевтическими свойствами. Будет набирать обороты и поиск новых ингибиторов методами системной биологии – например, путём анализа клеточных транскрипционных паттернов, характеризующих воздействия новых или ранее известных веществ [39, 205]. Большие перспективы, на наш взгляд, имеет также разработка комбинированной терапии с использованием ингибиторов разного типа [164, 165]. Помимо прикладного использования, благодаря разнообразным принципам работы эти ингибиторы могут также широко применяться в фундаментальных исследованиях для изучения регуляции биосинтеза белка в разных условиях [4, 16, 24, 82, 127, 134, 267, 305].

В данном обзоре мы попытались упомянуть основные типы низкомолекулярных ингибиторов эукариотической трансляции. Однако количество известных на данный момент веществ с подобной активностью, даже если рассматривать лишь ингибиторы с хорошо охарактеризованным механизмом действия, составляет несколько сотен, поэтому рассмотреть их все в рамках одной статьи не представляется возможным. Кроме того, этот список постоянно пополняется новыми веществами. Поэтому нами была разработана обновляемая база данных низкомолекулярных ингибиторов биосинтеза белка – «EuPSIC» (от *англ.* Eukaryotic Protein Synthesis Inhibiting Compounds»). В ней содержатся дополнительные поля, облегчающие машинную обработку данных, такие как номера PubChem и ссылки на литературные источники в PubMed. База данных размещена по адресу http://eupsic.belozersky.msu.ru/.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00291).

Благодарности. Авторы благодарят Максима Лашкевича за помощь в подготовке таблиц и администрацию компьютерного сервера НИИ ФХБ МГУ за помощь в размещении базы данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pelletier, J., and Sonenberg, N. (2019) The organizing principles of eukaryotic ribosome recruitment, *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 307-335, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111042.
2. Yusupova, G., and Yusupov, M. (2014) High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 467-486, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035445.
3. Weisser, M., and Ban, N. (2019) Extensions, extra factors, and extreme complexity: ribosomal structures provide insights into eukaryotic translation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, a032367, doi: 10.1101/cshperspect.a032367.
4. Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Loughran, G., Dmitriev, S. E., Baranov, P. V., and Shatsky, I. N. (2017) Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling, *Nucleic acids Res.*, **45**, 513-526, doi: 10.1093/nar/gkw1190.
5. Hinnebusch, A. G. (2017) Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 589-611, doi: 10.1016/j.tibs.2017.03.004.
6. Schuller, A. P., and Green, R. (2018) Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 526-541, doi: 10.1038/s41580-018-0011-4.
7. Wilson, D. N. (2009) The A-Z of bacterial translation inhibitors, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **44**, 393-433, doi: 10.3109/10409230903307311.
8. Lin, J., Zhou, D., Steitz, T. A., Polikanov, Y. S., and Gagnon, M. G. (2018) Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 451-478, doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-011942.
9. Yusupova, G., and Yusupov, M. (2017) Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors, *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **372**, 20160184, doi: 10.1098/rstb.2016.0184.
10. Vazquez, D. (1979) Inhibitors of protein biosynthesis, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, **30**, 1-312, doi: 10.1007/978-3-642-81309-2.
11. Pestka, S. (1971) Inhibitors of ribosome functions, *Annu. Rev. Microbiol.*, **25**, 487-562, doi: 10.1146/annurev.mi.25.100171.002415.
12. Pestka, S. (1974) The use of inhibitors in studies on protein synthesis, *Methods Enzymol.*, **30**, 261-282, doi: 10.1016/0076-6879(74)30030-4.
13. Jiménez, A., and Vázquez, D. (1983) *Novel Inhibitors of Translation in Eukaryotic Systems*, in *Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibitors* (Hahn, F. E. ed.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 248-254.
14. Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M. V., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2014) Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome, *Nature*, **513**, 517-522, doi: 10.1038/nature13737.
15. Barbacid, M., and Vazquez, D. (1974) (3H)anisomycin binding to eukaryotic ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **84**, 603-623, doi: 10.1016/0022-2836(74)90119-3.
16. Wu, C. C., Zinshteyn, B., Wehner, K. A., and Green, R. (2019) High-resolution ribosome profiling defines discrete ribosome elongation states and translational regulation during cellular stress, *Mol. Cell*, **73**, 959-970 e955, doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.009.
17. Barbacid, M., Fresno, M., and Vazquez, D. (1975) Inhibitors of polypeptide elongation on yeast polysomes, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **28**, 453-462, doi: 10.7164/antibiotics.28.453.
18. Fresno, M., Carrasco, L., and Vazquez, D. (1976) Initiation of the polypeptide chain by reticulocyte cell-free systems. Survey of different inhibitors of translation, *Eur. J. Biochem.*, **68**, 355-364, doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10822.x.
19. Cundliffe, E., Cannon, M., and Davies, J. (1974) Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 30-34, doi: 10.1073/pnas.71.1.30.
20. Pellegrino, S., Meyer, M., Zorbas, C., Bouchta, S. A., Saraf, K., Pelly, S. C., Yusupova, G., Evidente, A., Mathieu, V., Kornienko, A., Lafontaine, D. L. J., and Yusupov, M. (2018) The amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth, *Structure*, **26**, 416-425 e414, doi: 10.1016/j.str.2018.01.009.
21. Baez, A., and Vazquez, D. (1978) Binding of [3H]narciclasine to eukaryotic ribosomes. A study on a structure-activity relationship, *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 95-103, doi: 10.1016/0005-2787(78)90119-3.
22. Jimenez, A., Santos, A., Alonso, G., and Vazquez, D. (1976) Inhibitors of protein synthesis in eukarytic cells. Comparative effects of some amaryllidaceae alkaloids, *Biochim. Biophys. Acta*, **425**, 342-348, doi: 10.1016/0005-2787(76)90261-6.
23. Fresno, M., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1977) Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine, *Eur. J. Biochem.*, **72**, 323-330, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11256.x.
24. Ingolia, N. T., Lareau, L. F., and Weissman, J. S. (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes, *Cell*, **147**, 789-802, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002.
25. Tscherne, J. S., and Pestka, S. (1975) Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 479-487, doi: 10.1128/aac.8.4.479.
26. Gurel, G., Blaha, G., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2009) U2504 determines the species specificity of the A-site cleft antibiotics: the structures of tiamulin, homoharringtonine, and bruceantin bound to the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **389**, 146-156, doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.005.
27. Winer, E. S., and DeAngelo, D. J. (2018) A review of omacetaxine: a chronic myeloid leukemia treatment resurrected, *Oncol. Ther.*, **6**, 9-20, doi: 10.1007/s40487-018-0058-6.
28. Wang, Z., and Yang, L. (2020) Turning the tide: natural products and natural-product-inspired chemicals as potential counters to SARS-CoV-2 infection, *Front. Pharmacol.*, **11**, 1013, doi: 10.3389/fphar.2020.01013.
29. Huang, M. T. (1975) Harringtonine, an inhibitor of initiation of protein biosynthesis, *Mol. Pharmacol.*, **11**, 511-519.
30. Carter, C. J., and Cannon, M. (1977) Structural requirements for the inhibitory action of 12,13-epoxytrichothecenes on protein synthesis in eukaryotes, *Biochem. J.*, **166**, 399-409, doi: 10.1042/bj1660399.
31. Cannon, M., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1976) Competition between trichodermin and several other sesquiterpene antibiotics for binding to their receptor site(s) on eukaryotic ribosomes, *Biochem. J.*, **160**, 137-145, doi: 10.1042/bj1600137.
32. Ehrlich, K. C., and Daigle, K. W. (1987) Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes, *Biochim. Biophys. Acta*, **923**, 206-213, doi: 10.1016/0304-4165(87)90005-5.
33. Carter, C. J., and Cannon, M. (1978) Inhibition of eukaryotic ribosomal function by the sesquiterpenoid antibiotic

fusarenon-X, *Eur. J. Biochem.*, **84**, 103-111, doi: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12146.x.
34. Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., and Liu, J. O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 209-217, doi: 10.1038/nchembio.304.
35. Chan, J., Khan, S. N., Harvey, I., Merrick, W., and Pelletier, J. (2004) Eukaryotic protein synthesis inhibitors identified by comparison of cytotoxicity profiles, *RNA*, **10**, 528-543, doi: 10.1261/rna.5200204.
36. McClary, B., Zinshteyn, B., Meyer, M., Jouanneau, M., Pellegrino, S., Yusupova, G., Schuller, A., Reyes, J. C. P., Lu, J., Guo, Z., Ayinde, S., Luo, C., Dang, Y., Romo, D., Yusupov, M., Green, R., and Liu, J. O. (2017) Inhibition of eukaryotic translation by the antitumor natural product agelastatin A, *Cell Chem. Biol.*, **24**, 605-613 e605, doi: 10.1016/j.chembiol.2017.04.006.
37. Cuendet, M., and Pezzuto, J. M. (2004) Antitumor activity of bruceantin: an old drug with new promise, *J. Nat. Prod.*, **67**, 269-272, doi: 10.1021/np030304+.
38. Fresno, M., Gonzales, A., Vazquez, D., and Jimenez, A. (1978) Bruceantin, a novel inhibitor of peptide bond formation, *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 104-112, doi: 10.1016/0005-2787(78)90120-x.
39. Zhang, L. L., Guo, J., Jiang, X. M., Chen, X. P., Wang, Y. T., Li, A., Lin, L. G., Li, H., and Lu, J. J. (2020) Identification of nagilactone E as a protein synthesis inhibitor with anticancer activity, *Acta pharmacol. Sin.*, **41**, 698-705, doi: 10.1038/s41401-019-0332-7.
40. Polikanov, Y. S., Starosta, A. L., Juette, M. F., Altman, R. B., Terry, D. S., Lu, W., Burnett, B. J., Dinos, G., Reynolds, K. A., Blanchard, S. C., Steitz, T. A., and Wilson, D. N. (2015) Distinct tRNA accommodation intermediates observed on the ribosome with the antibiotics hygromycin A and A201A, *Mol. Cell*, **58**, 832-844, doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.014.
41. Amunts, A., Fiedorczuk, K., Truong, T. T., Chandler, J., Greenberg, E. P., and Ramakrishnan, V. (2015) Bactobolin A binds to a site on the 70S ribosome distinct from previously seen antibiotics, *J. Mol. Biol.*, **427**, 753-755, doi: 10.1016/j.jmb.2014.12.018.
42. Hori, M., Suzukake, K., Ishikawa, C., Asakura, H., and Umezawa, H. (1981) Biochemical studies on bactobolin in relation to actinobolin, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **34**, 465-468, doi: 10.7164/antibiotics.34.465.
43. Cerna, J., Rychlik, I., and Lichtenthaler, F. W. (1973) The effect of the aminoacyl-4-aminohexosyl-cytosine group of antibiotics on ribosomal peptidyl transferase, *FEBS Lett.*, **30**, 147-150, doi: 10.1016/0014-5793(73)80639-8.
44. Hansen, J. L., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit, *J. Mol. Biol.*, **330**, 1061-1075, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00668-5.
45. Svidritskiy, E., Ling, C., Ermolenko, D. N., and Korostelev, A. A. (2013) Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 12283-12288, doi: 10.1073/pnas.1304922110.
46. Lashkevich, K. A., Shlyk, V. I., Kushchenko, A. S., Gladyshev, V. N., Alkalaeva, E. Z., and Dmitriev, S. E. (2020) CTELS: a cell-free system for the analysis of translation termination rate, *Biomolecules*, **10**, 911, doi: 10.3390/biom10060911.
47. Gonzalez, A., Vazquez, D., and Jimenez, A. (1979) Inhibition of translation in bacterial and eukaryotic systems by the antibiotic anthelmycin (hikizimycin), *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 403-409, doi: 10.1016/0005-2787(79)90148-5.
48. Sikorski, M. M., Cerna, J., Rychlik, I., and Legocki, A. B. (1977) Peptidyl transferase activity in wheat germ ribosomes. Effect of some antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 123-130, doi: 10.1016/0005-2787(77)90346-x.
49. Leviev, I. G., Rodriguez-Fonseca, C., Phan, H., Garrett, R. A., Heilek, G., Noller, H. F., and Mankin, A. S. (1994) A conserved secondary structural motif in 23S rRNA defines the site of interaction of amicetin, a universal inhibitor of peptide bond formation, *EMBO J.*, **13**, 1682-1686.
50. Dmitriev, S. E., Akulich, K. A., Andreev, D. E., Terenin, I. M., and Shatsky, I. N. (2013) The peculiar mode of translation elongation inhibition by antitumor drug harringtonin, *FEBS J.*, **280**, 51-51.
51. Akulich, K. A., Sinitcyn, P. G., Lomakin, I. B., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Mironov, A. A., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2017) Peptidyl transferase inhibitors arrest the ribosome at specific amino acid codons: insights from an integrated approach, *FEBS J.*, **284**, 296-296, doi: 10.1111/febs.14174.
52. Michel, A. M., Andreev, D. E., and Baranov, P. V. (2014) Computational approach for calculating the probability of eukaryotic translation initiation from ribo-seq data that takes into account leaky scanning, *BMC Bioinform.*, **15**, 380, doi: 10.1186/s12859-014-0380-4.
53. Marks, J., Kannan, K., Roncase, E. J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C., Vazquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2016) Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12150-12155, doi: 10.1073/pnas.1613055113.
54. Vazquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2018) Context-specific action of ribosomal antibiotics, *Ann. Rev. Microbiol.*, **72**, 185-207, doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062329.
55. Kannan, K., Kanabar, P., Schryer, D., Florin, T., Oh, E., Bahroos, N., Tenson, T., Weissman, J. S., and Mankin, A. S. (2014) The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 15958-15963, doi: 10.1073/pnas.1417334111.
56. Mankin, A. S. (2008) Macrolide myths, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 414-421, doi: 10.1016/j.mib.2008.08.003.
57. Vazquez-Laslop, N., Thum, C., and Mankin, A. S. (2008) Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling, *Mol. Cell*, **30**, 190-202, doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.026.
58. Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2005) Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance, *Cell*, **121**, 257-270, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.005.
59. Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117-128, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00570-1.
60. Gurel, G., Blaha, G., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (2009) Structures of triacetyloleandomycin and mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of Haloarcula marismortui, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 5010-5014, doi: 10.1128/AAC.00817-09.
61. Nishimura, S., Matsunaga, S., Yoshida, M., Hirota, H., Yokoyama, S., and Fusetani, N. (2005) 13-Deoxytedanolide, a marine sponge-derived antitumor macrolide, binds to the 60S large ribosomal subunit, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 449-454, doi: 10.1016/j.bmc.2004.10.012.
62. Lintner, N. G., McClure, K. F., Petersen, D., Londregan, A. T., Piotrowski, D. W., Wei, L., Xiao, J., Bolt, M., Loria, P. M., Maguire, B., Geoghegan, K. F., Huang, A., Rolph, T.,

Liras, S., Doudna, J. A., Dullea, R. G., and Cate, J. H. (2017) Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain, *PLoS Biol.*, **15**, e2001882, doi: 10.1371/journal.pbio.2001882.
63. Liaud, N., Horlbeck, M. A., Gilbert, L. A., Gjoni, K., Weissman, J. S., and Cate, J. H. D. (2019) Cellular response to small molecules that selectively stall protein synthesis by the ribosome, *PLoS Genet.*, **15**, e1008057, doi: 10.1371/journal.pgen.1008057.
64. Li, W., Ward, F. R., McClure, K. F., Chang, S. T., Montabana, E., Liras, S., Dullea, R. G., and Cate, J. H. D. (2019) Structural basis for selective stalling of human ribosome nascent chain complexes by a drug-like molecule, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 501-509, doi: 10.1038/s41594-019-0236-8.
65. Osterman, I. A., Wieland, M., Maviza, T. P., Lashkevich, K. A., Lukianov, D. A., Komarova, E. S., Zakalyukina, Y. V., Buschauer, R., Shiriaev, D. I., Leyn, S. A., Zlamal, J. E., Biryukov, M. V., Skvortsov, D. A., Tashlitsky, V. N., Polshakov, V. I., Cheng, J., Polikanov, Y. S., Bogdanov, A. A., Osterman, A. L., Dmitriev, S. E., Beckmann, R., Dontsova, O. A., Wilson, D. N., and Sergiev, P. V. (2020) Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 1071-1077, doi: 10.1038/s41589-020-0578-x.
66. Mortison, J. D., Schenone, M., Myers, J. A., Zhang, Z., Chen, L., Ciarlo, C., Comer, E., Natchiar, S. K., Carr, S. A., Klaholz, B. P., and Myers, A. G. (2018) Tetracyclines modify translation by targeting key human rRNA substructures, *Cell Chem. Biol.*, **25**, 1506-1518 e1513, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.09.010.
67. Wu, C. C., Peterson, A., Zinshteyn, B., Regot, S., and Green, R. (2020) Ribosome collisions trigger general stress responses to regulate cell fate, *Cell*, **182**, 404-416 e414, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.006.
68. Jenner, L., Starosta, A. L., Terry, D. S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Wilson, D. N., and Yusupova, G. (2013) Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3812-3816, doi: 10.1073/pnas.1216691110.
69. Solis, G. M., Kardakaris, R., Valentine, E. R., Bar-Peled, L., Chen, A. L., Blewett, M. M., McCormick, M. A., Williamson, J. R., Kennedy, B., Cravatt, B. F., and Petrascheck, M. (2018) Translation attenuation by minocycline enhances longevity and proteostasis in old post-stress-responsive organisms, *eLife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.40314.
70. Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., and Galvez, J. (2013) Minocycline: far beyond an antibiotic, *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 337-352, doi: 10.1111/bph.12139.
71. Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., and Hardesty, B. (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **246**, 174-181.
72. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6, *Science*, **334**, 941-948, doi: 10.1126/science.1211204.
73. Dmitriev, S. E., Pisarev, A. V., Rubtsova, M. P., Dunaevsky, Y. E., and Shatsky, I. N. (2003) Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting, *FEBS Lett.*, **533**, 99-104, doi: 10.1016/s0014-5793(02)03776-6.
74. Budkevich, T., Giesebrecht, J., Altman, R. B., Munro, J. B., Mielke, T., Nierhaus, K. H., Blanchard, S. C., and Spahn, C. M. (2011) Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex, *Mol. Cell*, **44**, 214-224, doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.040.
75. Myasnikov, A. G., Kundhavai Natchiar, S., Nebout, M., Hazemann, I., Imbert, V., Khatter, H., Peyron, J. F., and Klaholz, B. P. (2016) Structure-function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics, *Nat. Commun.*, **7**, 12856, doi: 10.1038/ncomms12856.
76. Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2003) Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA, *Gen. Dev.*, **17**, 181-186, doi: 10.1101/gad.1040803.
77. Iwasaki, S., and Ingolia, N. T. (2017) The growing toolbox for protein synthesis studies, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 612-624, doi: 10.1016/j.tibs.2017.05.004.
78. Park, Y., Koga, Y., Su, C., Waterbury, A. L., Johnny, C. L., and Liau, B. B. (2019) Versatile synthetic route to cycloheximide and analogues that potently inhibit translation elongation, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **58**, 5387-5391, doi: 10.1002/anie.201901386.
79. Landsman, D., Srikantha, T., and Bustin, M. (1988) Single copy gene for the chicken non-histone chromosomal protein HMG-17, *J. Biol. Chem.*, **263**, 3917-3923.
80. Zhang, D., Yi, W., Ge, H., Zhang, Z., and Wu, B. (2019) Bioactive streptoglutarimides A-J from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ741, *J. Nat. Prod.*, **82**, 2800-2808, doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00481.
81. Sugawara, K., Nishiyama, Y., Toda, S., Komiyama, N., Hatori, M., Moriyama, T., Sawada, Y., Kamei, H., Konishi, M., and Oki, T. (1992) Lactimidomycin, a new glutarimide group antibiotic. Production, isolation, structure and biological activity, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **45**, 1433-1441, doi: 10.7164/antibiotics.45.1433.
82. Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S. X., Shen, B., and Qian, S. B. (2012) Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2424-2432, doi: 10.1073/pnas.1207846109.
83. Pellegrino, S., Meyer, M., Konst, Z. A., Holm, M., Voora, V. K., Kashinskaya, D., Zanette, C., Mobley, D. L., Yusupova, G., Vanderwal, C. D., Blanchard, S. C., and Yusupov, M. (2019) Understanding the role of intermolecular interactions between lissoclimides and the eukaryotic ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3223-3232, doi: 10.1093/nar/gkz053.
84. Konst, Z. A., Szklarski, A. R., Pellegrino, S., Michalak, S. E., Meyer, M., Zanette, C., Cencic, R., Nam, S., Voora, V. K., Horne, D. A., Pelletier, J., Mobley, D. L., Yusupova, G., Yusupov, M., and Vanderwal, C. D. (2017) Synthesis facilitates an understanding of the structural basis for translation inhibition by the lissoclimides, *Nat. Chem.*, **9**, 1140-1149, doi: 10.1038/nchem.2800.
85. Robert, F., Gao, H. Q., Donia, M., Merrick, W. C., Hamann, M. T., and Pelletier, J. (2006) Chlorolissoclimides: new inhibitors of eukaryotic protein synthesis, *RNA*, **12**, 717-725, doi: 10.1261/rna.2346806.
86. Lee, K. H., Nishimura, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2005) Inhibition of protein synthesis and activation of stress-activated protein kinases by onnamide A and theopederin B, antitumor marine natural products, *Cancer Sci.*, **96**, 357-364, doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00055.x.
87. Brega, A., Falaschi, A., De Carli, L., and Pavan, M. (1968) Studies on the mechanism of action of pederine, *J. Cell Biol.*, **36**, 485-496, doi: 10.1083/jcb.36.3.485.
88. Jacobs-Lorena, M., Brega, A., and Baglioni, C. (1971) Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics. V. Mechanism of action of pederine, an inhibitor of initiation and elongation, *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 263-272.

89. Schroeder, S. J., Blaha, G., Tirado-Rives, J., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (2007) The structures of antibiotics bound to the E site region of the 50 S ribosomal subunit of Haloarcula marismortui: 13-deoxytedanolide and girodazole, *J. Mol. Biol.*, **367**, 1471-1479, doi: 10.1016/j.jmb.2007.01.081.
90. Taylor, R. E. (2008) Tedanolide and the evolution of polyketide inhibitors of eukaryotic protein synthesis, *Nat. Prod. Rep.*, **25**, 854-861, doi: 10.1039/b805700c.
91. Hines, J., Roy, M., Cheng, H., Agapakis, C. M., Taylor, R., and Crews, C. M. (2006) Myriaporone 3/4 structure—activity relationship studies define a pharmacophore targeting eukaryotic protein synthesis, *Mol. Biosyst.*, **2**, 371-379, doi: 10.1039/b602936a.
92. Muthukumar, Y., Roy, M., Raja, A., Taylor, R. E., and Sasse, F. (2013) The marine polyketide myriaporone 3/4 stalls translation by targeting the elongation phase, *Chembiochem*, 14, 260-264, doi: 10.1002/cbic.201200522.
93. Prokhorova, I. V., Akulich, K. A., Makeeva, D. S., Osterman, I. A., Skvortsov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Yusupova, G., Yusupov, M. M., and Dmitriev, S. E. (2016) Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome, *Sci. Rep.*, **6**, 27720, doi: 10.1038/srep27720.
94. Wong, W., Bai, X. C., Brown, A., Fernandez, I. S., Hanssen, E., Condron, M., Tan, Y. H., Baum, J., and Scheres, S. H. (2014) Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine, *eLife*, **3**, doi: 10.7554/eLife.03080.
95. Chang, S., and Wasmuth, J. J. (1983) Construction and characterization of Chinese hamster cell EmtA EmtB double mutants, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 761-772, doi: 10.1128/mcb.3.5.761.
96. Grant, P., Sanchez, L., and Jimenez, A. (1974) Cryptopleurine resistance: genetic locus for a 40S ribosomal component in Saccharomyces cerevisiae, *J. Bacteriol.*, **120**, 1308-1314, doi: 10.1128/JB.120.3.1308-1314.1974.
97. Gupta, R. S., and Siminovitch, L. (1977) Mutants of CHO cells resistant to the protein synthesis inhibitors, cryptopleurine and tylocrebrine: genetic and biochemical evidence for common site of action of emetine, cryptopleurine, tylocrebine, and tubulosine, *Biochemistry*, **16**, 3209-3214, doi: 10.1021/bi00633a026.
98. Bucher, K., and Skogerson, L. (1976) Cryptopleurine—an inhibitor of translocation, *Biochemistry*, **15**, 4755-4759, doi: 10.1021/bi00667a001.
99. Carrasco, L., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1976) Specific inhibition of translocation by tubulosine in eukaryotic polysomes, *Eur. J. Biochem.*, **64**, 1-5, doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10268.x.
100. Wang, Y., Wong, H. C., Gullen, E. A., Lam, W., Yang, X., Shi, Q., Lee, K. H., and Cheng, Y. C. (2012) Cryptopleurine analogs with modification of e ring exhibit different mechanism to rac-cryptopleurine and tylophorine, *PloS One*, **7**, e51138, doi: 10.1371/journal.pone.0051138.
101. Donaldson, G. R., Atkinson, M. R., and Murray, A. W. (1968) Inhibition of protein synthesis in Ehrlich ascites-tumour cells by the phenanthrene alkaloids tylophorine, tylocrebrine and cryptopleurine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 104-109, doi: 10.1016/0006-291x(68)90037-5.
102. 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., and Sergiev, P. V. (2014) Amicoumacin a inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome, *Mol. Cell*, **56**, 531-540, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.020.
103. Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit, *Cell*, **103**, 1143-1154, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00216-6.
104. Dinos, G., Wilson, D. N., Teraoka, Y., Szaflarski, W., Fucini, P., Kalpaxis, D., and Nierhaus, K. H. (2004) Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding, *Mol. Cell*, **13**, 113-124, doi: 10.1016/s1097-2765(04)00002-4.
105. Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K., and Cate, J. H. (2008) Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis, *RNA*, **14**, 1590-1599, doi: 10.1261/rna.1076908.
106. Gonzalez, A., Jimenez, A., Vazquez, D., Davies, J. E., and Schindler, D. (1978) Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes, *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 459-469, doi: 10.1016/0005-2787(78)90287-3.
107. Misumi, M., Nishimura, T., Komai, T., and Tanaka, N. (1978) Interaction of kanamycin and related antibiotics with the large subunit of ribosomes and the inhibition of translocation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 358-365, doi: 10.1016/0006-291x(78)90178-x.
108. Cabanas, M. J., Vazquez, D., and Modolell, J. (1978) Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 991-997, doi: 10.1016/0006-291x(78)91493-6.
109. Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. (2007) Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 727-732, doi: 10.1038/nsmb1271.
110. Prokhorova, I., Altman, R. B., Djumagulov, M., Shrestha, J. P., Urzhumtsev, A., Ferguson, A., Chang, C. T., Yusupov, M., Blanchard, S. C., and Yusupova, G. (2017) Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10899-E10908, doi: 10.1073/pnas.1715501114.
111. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., and Connolly, L. E. (2016) Aminoglycosides: an overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, doi: 10.1101/cshperspect.a027029.
112. Wilhelm, J. M., Pettitt, S. E., and Jessop, J. J. (1978) Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: structure—function relationships in the stimulation of misreading with a wheat embryo system, *Biochemistry*, **17**, 1143-1149, doi: 10.1021/bi00600a001.
113. Howard, M., Frizzell, R. A., and Bedwell, D. M. (1996) Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations, *Nat. Med.*, **2**, 467-469, doi: 10.1038/nm0496-467.
114. Kandasamy, J., Atia-Glikin, D., Shulman, E., Shapira, K., Shavit, M., Belakhov, V., and Baasov, T. (2012) Increased selectivity toward cytoplasmic versus mitochondrial ribosome confers improved efficiency of synthetic aminoglycosides in fixing damaged genes: a strategy for treatment of genetic diseases caused by nonsense mutations, *J. Med. Chem.*, **55**, 10630-10643, doi: 10.1021/jm3012992.
115. Wangen, J. R., and Green, R. (2020) Stop codon context influences genome-wide stimulation of termination codon readthrough by aminoglycosides, *eLife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.52611.
116. Kuang, L., Hashimoto, K., Huang, E. J., Gentry, M. S., and Zhu, H. (2020) Frontotemporal dementia nonsense mutation of progranulin rescued by aminoglycosides,

Hum. Mol. Genet., **29**, 624-634, doi: 10.1093/hmg/ddz280.
117. Sabbavarapu, N. M., Shavit, M., Degani, Y., Smolkin, B., Belakhov, V., and Baasov, T. (2016) Design of novel aminoglycoside derivatives with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations, *ACS Med. Chem. Lett.*, **7**, 418-423, doi: 10.1021/acsmedchemlett.6b00006.
118. Shalev, M., and Baasov, T. (2014) When proteins start to make sense: fine-tuning aminoglycosides for PTC suppression therapy, *Medchemcomm.*, **5**, 1092-1105, doi: 10.1039/C4MD00081A.
119. Bidou, L., Bugaud, O., Belakhov, V., Baasov, T., and Namy, O. (2017) Characterization of new-generation aminoglycoside promoting premature termination codon readthrough in cancer cells, *RNA Biol.*, **14**, 378-388, doi: 10.1080/15476286.2017.1285480.
120. Mattis, V. B., Rai, R., Wang, J., Chang, C. W., Coady, T., and Lorson, C. L. (2006) Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts, *Hum. Genet.*, **120**, 589-601, doi: 10.1007/s00439-006-0245-7.
121. Baradaran-Heravi, A., Niesser, J., Balgi, A. D., Choi, K., Zimmerman, C., South, A. P., Anderson, H. J., Strynadka, N. C., Bally, M. B., and Roberge, M. (2017) Gentamicin B1 is a minor gentamicin component with major nonsense mutation suppression activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 3479-3484, doi: 10.1073/pnas.1620982114.
122. Fan-Minogue, H., and Bedwell, D. M. (2008) Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity, *RNA*, **14**, 148-157, doi: 10.1261/rna.805208.
123. Recht, M. I., Douthwaite, S., and Puglisi, J. D. (1999) Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics, *EMBO J.*, **18**, 3133-3138, doi: 10.1093/emboj/18.11.3133.
124. Wargo, K. A., and Edwards, J. D. (2014) Aminoglycoside-induced nephrotoxicity, *J. Pharm. Pract.*, **27**, 573-577, doi: 10.1177/0897190014546836.
125. Nguyen, T., and Jeyakumar, A. (2019) Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, **120**, 15-19, doi: 10.1016/j.ijporl.2019.02.002.
126. Aviner, R. (2020) The science of puromycin: from studies of ribosome function to applications in biotechnology, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 1074-1083, doi: 10.1016/j.csbj.2020.04.014.
127. Fritsch, C., Herrmann, A., Nothnagel, M., Szafranski, K., Huse, K., Schumann, F., Schreiber, S., Platzer, M., Krawczak, M., Hampe, J., and Brosch, M. (2012) Genome-wide search for novel human uORFs and N-terminal protein extensions using ribosomal footprinting, *Genome Res.*, **22**, 2208-2218, doi: 10.1101/gr.139568.112.
128. Hobson, B. D., Kong, L., Hartwick, E. W., Gonzalez Jr., R. L., and Sims, P. A., (2020) Elongation inhibitors do not prevent the release of puromycylated nascent polypeptide chains from ribosomes, *Elife*, **9**, e60048, doi: 10.7554/eLife.60048.
129. Enam, S. U., Zinshteyn, B., Goldman, D. H., Cassani, M., Livingston, N. M., Seydoux, G., and Green, R. (2020) Puromycin reactivity does not accurately localize translation at the subcellular level, *Elife*, **9**, e60303, doi: 10.7554/eLife.60303.
130. Wong, W., Bai, X. C., Sleebs, B. E., Triglia, T., Brown, A., Thompson, J. K., Jackson, K. E., Hanssen, E., Marapana, D. S., Fernandez, I. S., Ralph, S. A., Cowman, A. F., Scheres, S. H. W., and Baum, J. (2017) Mefloquine targets the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome to inhibit protein synthesis, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17031, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.31.
131. Shi, W. W., Mak, A. N., Wong, K. B., and Shaw, P. C. (2016) Structures and ribosomal interaction of ribosome-inactivating proteins, *Molecules*, **21**, 1588, doi: 10.3390/molecules21111588.
132. Olombrada, M., Lazaro-Gorines, R., Lopez-Rodriguez, J. C., Martinez-Del-Pozo, A., Onaderra, M., Maestro-Lopez, M., Lacadena, J., Gavilanes, J. G., and Garcia-Ortega, L. (2017) Fungal ribotoxins: a review of potential biotechnological applications, *Toxins*, **9**, 71, doi: 10.3390/toxins9020071.
133. Kozak, M., and Shatkin, A. J. (1978) Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of edeine, *J. Biol. Chem.*, **253**, 6568-6577.
134. Vassilenko, K. S., Alekhina, O. M., Dmitriev, S. E., Shatsky, I. N., and Spirin, A. S. (2011) Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5555-5567, doi: 10.1093/nar/gkr147.
135. Kozak, M. (2007) Some thoughts about translational regulation: forward and backward glances, *J. Cell. Biochem.*, **102**, 280-290, doi: 10.1002/jcb.21464.
136. Contreras, A., and Carrasco, L. (1979) Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells, *J. Virol.*, **29**, 114-122, doi: 10.1128/JVI.29.1.114-122.1979.
137. Baxter, R., Knell, V. C., Somerville, H. J., Swain, H. M., and Weeks, D. P. (1973) Effect of MDMP on protein synthesis in wheat and bacteria, *Nat. New Biol.*, **243**, 139-142, doi: 10.1038/newbio243139a0.
138. Mokas, S., Mills, J. R., Garreau, C., Fournier, M. J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., Pelletier, J., and Mazroui, R. (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2673-2683, doi: 10.1091/mbc.E08-10-1061.
139. Weeks, D. P., and Baxter, R. (1972) Specific inhibition of peptide-chain initiation by 2-(4-methyl-2,6-dinitroanilino)-N-methylpropionamide, *Biochemistry*, **11**, 3060-3064, doi: 10.1021/bi00766a018.
140. Baxter, R., and McGowan, J. E. (1976) MDMP action: degradative effects on polyribosomes from wheat roots and the inhibition of protein initiation, *J. Exp. Bot.*, **27**, 525-531, doi: 10.1093/jxb/27.3.525.
141. Gritz, L. R., Mitlin, J. A., Cannon, M., Littlewood, B., Carter, C. J., and Davies, J. E. (1982) Ribosome structure, maturation of ribosomal RNA and drug sensitivity in temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.*, **188**, 384-391, doi: 10.1007/BF00330038.
142. Pesce, E., Miluzio, A., Turcano, L., Minici, C., Cirino, D., Calamita, P., Manfrini, N., Oliveto, S., Ricciardi, S., Grifantini, R., Degano, M., Bresciani, A., and Biffo, S. (2020) Discovery and preliminary characterization of translational modulators that impair the binding of eIF6 to 60S ribosomal subunits, *Cells*, **9**, doi: 10.3390/cells9010172.
143. Brina, D., Miluzio, A., Ricciardi, S., and Biffo, S. (2015) eIF6 anti-association activity is required for ribosome biogenesis, translational control and tumor progression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1849**, 830-835, doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.09.010.
144. Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vazquez-Laslop, N., Wilson, D. N., Rodnina, M. V., and Mankin, A. S. (2017) An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 752-757, doi: 10.1038/nsmb.3439.
145. Colson, G., Rabault, B., Lavelle, F., and Zerial, A. (1992) Mode of action of the antitumor compound girodazole (RP 49532A, NSC 627434), *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1717-1723, doi: 10.1016/0006-2952(92)90701-j.

146. Lavelle, F., Zerial, A., Fizames, C., Rabault, B., and Curaudeau, A. (1991) Antitumor activity and mechanism of action of the marine compound girodazole, *Invest. New Drugs*, **9**, 233-244, doi: 10.1007/bf00176976.
147. Catimel, G., Coquard, R., Guastalla, J. P., Merrouche, Y., Le Bail, N., Alakl, M. K., Dumortier, A., Foy, M., and Clavel, M. (1995) Phase I study of RP 49532A, a new protein-synthesis inhibitor, in patients with advanced refractory solid tumors, *Cancer chemother. Pharmacol.*, **35**, 246-248, doi: 10.1007/BF00686555.
148. Bordeira-Carrico, R., Pego, A. P., Santos, M., and Oliveira, C. (2012) Cancer syndromes and therapy by stop-codon readthrough, *Trends Mol. Med.*, **18**, 667-678, doi: 10.1016/j.molmed.2012.09.004.
149. Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D. N., and Chuzhanova, N. A. (2008) A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease, *Hum. Mut.*, **29**, 1037-1047, doi: 10.1002/humu.20763.
150. Keeling, K. M., Xue, X., Gunn, G., and Bedwell, D. M. (2014) Therapeutics based on stop codon readthrough, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **15**, 371-394, doi: 10.1146/annurev-genom-091212-153527.
151. Lee, H. L., and Dougherty, J. P. (2012) Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases, *Pharmacol. Ther.*, **136**, 227-266, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.007.
152. Ng, M. Y., Zhang, H., Weil, A., Singh, V., Jamiolkowski, R., Baradaran-Heravi, A., Roberge, M., Jacobson, A., Friesen, W., Welch, E., Goldman, Y. E., and Cooperman, B. S. (2018) New *in vitro* assay measuring direct interaction of nonsense suppressors with the eukaryotic protein synthesis machinery, *ACS Med. Chem. Lett.*, **9**, 1285-1291, doi: 10.1021/acsmedchemlett.8b00472.
153. Floquet, C., Rousset, J. P., and Bidou, L. (2011) Readthrough of premature termination codons in the adenomatous polyposis coli gene restores its biological activity in human cancer cells, *PloS One*, **6**, e24125, doi: 10.1371/journal.pone.0024125.
154. Prayle, A., and Smyth, A. R. (2010) Aminoglycoside use in cystic fibrosis: therapeutic strategies and toxicity, *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **16**, 604-610, doi: 10.1097/MCP.0b013e32833eebfd.
155. Zingman, L. V., Park, S., Olson, T. M., Alekseev, A. E., and Terzic, A. (2007) Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **81**, 99-103, doi: 10.1038/sj.clpt.6100012.
156. Lentini, L., Melfi, R., Di Leonardo, A., Spinello, A., Barone, G., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., and Pibiri, I. (2014) Toward a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay, *Mol. Pharm.*, **11**, 653-664, doi: 10.1021/mp400230s.
157. Konstan, M. W., VanDevanter, D. R., Rowe, S. M., Wilschanski, M., Kerem, E., Sermet-Gaudelus, I., DiMango, E., Melotti, P., McIntosh, J., and De Boeck, K. (2020) Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF), *J. Cyst. Fibros.*, **19**, 595-601, doi: 10.1016/j.jcf.2020. 01.007.
158. Zainal Abidin, N., Haq, I. J., Gardner, A. I., and Brodlie, M. (2017) Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Exp. Opin. Pharmacother.*, **18**, 1363-1371, doi: 10.1080/14656566.2017.1359255.
159. Auld, D. S., Thorne, N., Maguire, W. F., and Inglese, J. (2009) Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3585-3590, doi: 10.1073/pnas.0813345106.
160. Altamura, E., Borgatti, M., Finotti, A., Gasparello, J., Gambari, R., Spinelli, M., Castaldo, R., and Altamura, N. (2016) Chemical-induced read-through at premature termination codons determined by a rapid dual-fluorescence system based on *S. cerevisiae*, *PloS One*, **11**, e0154260, doi: 10.1371/journal.pone.0154260.
161. Hamada, K., Omura, N., Taguchi, A., Baradaran-Heravi, A., Kotake, M., Arai, M., Takayama, K., Taniguchi, A., Roberge, M., and Hayashi, Y. (2019) New negamycin-based potent readthrough derivative effective against TGA-type nonsense mutations, *ACS Med. Chem. Lett.*, **10**, 1450-1456, doi: 10.1021/acsmedchemlett.9b00273.
162. Arakawa, M., Shiozuka, M., Nakayama, Y., Hara, T., Hamada, M., Kondo, S., Ikeda, D., Takahashi, Y., Sawa, R., Nonomura, Y., Sheykholeslami, K., Kondo, K., Kaga, K., Kitamura, T., Suzuki-Miyagoe, Y., Takeda, S., and Matsuda, R. (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice, *J. Biochem.*, **134**, 751-758, doi: 10.1093/jb/mvg203.
163. Olivier, N. B., Altman, R. B., Noeske, J., Basarab, G. S., Code, E., Ferguson, A. D., Gao, N., Huang, J., Juette, M. F., Livchak, S., Miller, M. D., Prince, D. B., Cate, J. H., Buurman, E. T., and Blanchard, S. C. (2014) Negamycin induces translational stalling and miscoding by binding to the small subunit head domain of the *Escherichia coli* ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16274-16279, doi: 10.1073/pnas.1414401111.
164. Ferguson, M. W., Gerak, C. A. N., Chow, C. C. T., Rastelli, E. J., Elmore, K. E., Stahl, F., Hosseini-Farahabadi, S., Baradaran-Heravi, A., Coltart, D. M., and Roberge, M. (2019) The antimalarial drug mefloquine enhances TP53 premature termination codon readthrough by aminoglycoside G418, *PloS One*, **14**, e0216423, doi: 10.1371/journal.pone.0216423.
165. Baradaran-Heravi, A., Balgi, A. D., Zimmerman, C., Choi, K., Shidmoossavee, F. S., Tan, J. S., Bergeaud, C., Krause, A., Flibotte, S., Shimizu, Y., Anderson, H. J., Mouly, V., Jan, E., Pfeifer, T., Jaquith, J. B., and Roberge, M. (2016) Novel small molecules potentiate premature termination codon readthrough by aminoglycosides, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6583-6598, doi: 10.1093/nar/gkw638.
166. Nurenberg-Goloub, E., and Tampe, R. (2019) Ribosome recycling in mRNA translation, quality control, and homeostasis, *Biol. Chem.*, **401**, 47-61, doi: 10.1515/hsz-2019-0279.
167. Buskirk, A. R., and Green, R. (2017) Ribosome pausing, arrest and rescue in bacteria and eukaryotes, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **372**, 20160183, doi: 10.1098/rstb.2016.0183.
168. Hirokawa, G., Kiel, M. C., Muto, A., Selmer, M., Raj, V. S., Liljas, A., Igarashi, K., Kaji, H., and Kaji, A. (2002) Post-termination complex disassembly by ribosome recycling factor, a functional tRNA mimic, *EMBO J.*, **21**, 2272-2281, doi: 10.1093/emboj/21.9.2272.
169. Kurata, S., Shen, B., Liu, J. O., Takeuchi, N., Kaji, A., and Kaji, H. (2013) Possible steps of complete disassembly of post-termination complex by yeast eEF3 deduced from inhibition by translocation inhibitors, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 264-276, doi: 10.1093/nar/gks958.
170. Kurata, S., Nielsen, K. H., Mitchell, S. F., Lorsch, J. R., Kaji, A., and Kaji, H. (2010) Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10854-10859, doi: 10.1073/pnas.1006247107.
171. Borg, A., Pavlov, M., and Ehrenberg, M. (2016) Mechanism of fusidic acid inhibition of RRF- and EF-G-dependent splitting of the bacterial post-termination ribo-

some, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3264-3275, doi: 10.1093/nar/gkw178.
172. Sanchez-Murcia, P. A., Cortes-Cabrera, A., and Gago, F. (2017) Structural rationale for the cross-resistance of tumor cells bearing the A399V variant of elongation factor eEF1A1 to the structurally unrelated didemnin B, ternatin, nannocystin A and ansatrienin B, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **31**, 915-928, doi: 10.1007/s10822-017-0066-x.
173. Carelli, J. D., Sethofer, S. G., Smith, G. A., Miller, H. R., Simard, J. L., Merrick, W. C., Jain, R. K., Ross, N. T., and Taunton, J. (2015) Ternatin and improved synthetic variants kill cancer cells by targeting the elongation factor-1A ternary complex, *eLife*, **4**, doi: 10.7554/eLife.10222.
174. Lee, J., Currano, J. N., Carroll, P. J., and Joullie, M. M. (2012) Didemnins, tamandarins and related natural products, *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 404-424, doi: 10.1039/c2np00065b.
175. SirDeshpande, B. V., and Toogood, P. L. (1995) Mechanism of protein synthesis inhibition by didemnin B *in vitro*, *Biochemistry*, **34**, 9177-9184, doi: 10.1021/bi00028a030.
176. Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., and Hegde, R. S. (2016) Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes, *Cell*, **167**, 1229-1240 e1215, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.046.
177. Losada, A., Munoz-Alonso, M. J., Garcia, C., Sanchez-Murcia, P. A., Martinez-Leal, J. F., Dominguez, J. M., Lillo, M. P., Gago, F., and Galmarini, C. M. (2016) Translation elongation factor eEF1A2 is a novel anticancer target for the marine natural product plitidepsin, *Sci. Rep.*, **6**, 35100, doi: 10.1038/srep35100.
178. Adrio, J., Cuevas, C., Manzanares, I., and Joullie, M. M. (2007) Total synthesis and biological evaluation of tamandarin B analogues, *J. Org. Chem.*, **72**, 5129-5138, doi: 10.1021/jo070412r.
179. Lindqvist, L., Robert, F., Merrick, W., Kakeya, H., Fraser, C., Osada, H., and Pelletier, J. (2010) Inhibition of translation by cytotrienin A—a member of the ansamycin family, *RNA*, **16**, 2404-2413, doi: 10.1261/rna.2307710.
180. Yamada, Y., Tashiro, E., Taketani, S., Imoto, M., and Kataoka, T. (2011) Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **64**, 361-366, doi: 10.1038/ja.2011.23.
181. Krastel, P., Roggo, S., Schirle, M., Ross, N. T., Perruccio, F., Aspesi, P., Jr., Aust, T., Buntin, K., Estoppey, D., Liechty, B., Mapa, F., Memmert, K., Miller, H., Pan, X., Riedl, R., Thibaut, C., Thomas, J., Wagner, T., Weber, E., Xie, X., Schmitt, E. K., and Hoepfner, D. (2015) Nannocystin A: an Elongation Factor 1 Inhibitor from Myxobacteria with Differential Anti-Cancer Properties, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, 10149-10154, doi: 10.1002/anie.201505069.
182. Justice, M. C., Hsu, M. J., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D., and Nielsen, J. (1998) Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 3148-3151, doi: 10.1074/jbc.273.6.3148.
183. Dominguez, J. M., Kelly, V. A., Kinsman, O. S., Marriott, M. S., Gomez de las Heras, F., and Martin, J. J. (1998) Sordarins: a new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2274-2278, doi: 10.1128/AAC.42.9.2274.
184. Basilio, A., Justice, M., Harris, G., Bills, G., Collado, J., de la Cruz, M., Diez, M. T., Hernandez, P., Liberator, P., Nielsen kahn, J., Pelaez, F., Platas, G., Schmatz, D., Shastry, M., Tormo, J. R., Andersen, G. R., and Vicente, F. (2006) The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 560-566, doi: 10.1016/j.bmc.2005.08.046.
185. Herreros, E., Almela, M. J., Lozano, S., Gomez de las Heras, F., and Gargallo-Viola, D. (2001) Antifungal activities and cytotoxicity studies of six new azasordarins, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 3132-3139, doi: 10.1128/AAC.45.11.3132-3139.2001.
186. Jorgensen, R., Ortiz, P. A., Carr-Schmid, A., Nissen, P., Kinzy, T. G., and Andersen, G. R. (2003) Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 379-385, doi: 10.1038/nsb923.
187. Soe, R., Mosley, R. T., Justice, M., Nielsen-Kahn, J., Shastry, M., Merrill, A. R., and Andersen, G. R. (2007) Sordarin derivatives induce a novel conformation of the yeast ribosome translocation factor eEF2, *J. Biol. Chem.*, **282**, 657-666, doi: 10.1074/jbc.M607830200.
188. Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P., and Frank, J. (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation, *EMBO J.*, **23**, 1008-1019, doi: 10.1038/sj.emboj.7600102.
189. Malkin, M., and Lipmann, F. (1969) Fusidic acid: inhibition of factor T2 in reticulocyte protein synthesis, *Science*, **164**, 71-72, doi: 10.1126/science.164.3875.71.
190. Botet, J., Rodriguez-Mateos, M., Ballesta, J. P., Revuelta, J. L., and Remacha, M. (2008) A chemical genomic screen in Saccharomyces cerevisiae reveals a role for diphthamidation of translation elongation factor 2 in inhibition of protein synthesis by sordarin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1623-1629, doi: 10.1128/AAC.01603-07.
191. Yates, S. P., Jorgensen, R., Andersen, G. R., and Merrill, A. R. (2006) Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins, *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 123-133, doi: 10.1016/j.tibs.2005.12.007.
192. Stickel, S. A., Gomes, N. P., Frederick, B., Raben, D., and Su, T. T. (2015) Bouvardin is a radiation modulator with a novel mechanism of action, *Radiat. Res.*, **184**, 392-403, doi: 10.1667/RR14068.1.
193. Zalacain, M., Zaera, E., Vazquez, D., and Jimenez, A. (1982) The mode of action of the antitumor drug bouvardin, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells, *FEBS Lett.*, **148**, 95-97, doi: 10.1016/0014-5793(82)81250-7.
194. Rambelli, F., Brigotti, M., Zamboni, M., Denaro, M., Montanaro, L., and Sperti, S. (1989) Effect of the antibiotic purpuromycin on cell-free protein-synthesizing systems, *Biochem. J.*, **259**, 307-310, doi: 10.1042/bj2590307.
195. Baragana, B., Hallyburton, I., Lee, M. C., Norcross, N. R., Grimaldi, R., et al. (2015) A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis, *Nature*, **522**, 315-320, doi: 10.1038/nature14451.
196. Turpaev, K. T. (2018) Translation factor eIF5A, modification with hypusine and role in regulation of gene expression. eIF5A as a target for pharmacological interventions, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 863-873, doi: 10.1134/S0006297918080011.
197. Dong, Z., and Zhang, J. T. (2003) EIF3 p170, a mediator of mimosine effect on protein synthesis and cell cycle progression, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3942-3951, doi: 10.1091/mbc.e02-12-0784.
198. Moerke, N. J., Aktas, H., Chen, H., Cantel, S., Reibarkh, M. Y., Fahmy, A., Gross, J. D., Degterev, A., Yuan, J., Chorev, M., Halperin, J. A., and Wagner, G. (2007) Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G, *Cell*, **128**, 257-267, doi: 10.1016/j.cell.2006.11.046.

199. Sekiyama, N., Arthanari, H., Papadopoulos, E., Rodriguez-Mias, R. A., Wagner, G., and Leger-Abraham, M. (2015) Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E-BP1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E4036-E4045, doi: 10.1073/pnas.1512118112.
200. Papadopoulos, E., Jenni, S., Kabha, E., Takrouri, K. J., Yi, T., Salvi, N., Luna, R. E., Gavathiotis, E., Mahalingam, P., Arthanari, H., Rodriguez-Mias, R., Yefidoff-Freedman, R., Aktas, B. H., Chorev, M., Halperin, J. A., and Wagner, G. (2014) Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E3187-3195, doi: 10.1073/pnas.1410250111.
201. Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Terenin, I. M. (2014) Transcriptome-wide studies uncover the diversity of modes of mRNA recruitment to eukaryotic ribosomes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **49**, 164-177, doi: 10.3109/10409238.2014.887051.
202. Cencic, R., Hall, D. R., Robert, F., Du, Y., Min, J., Li, L., Qui, M., Lewis, I., Kurtkaya, S., Dingledine, R., Fu, H., Kozakov, D., Vajda, S., and Pelletier, J. (2011) Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1046-1051, doi: 10.1073/pnas.1011477108.
203. Cencic, R., Desforges, M., Hall, D. R., Kozakov, D., Du, Y., Min, J., Dingledine, R., Fu, H., Vajda, S., Talbot, P. J., and Pelletier, J. (2011) Blocking eIF4E-eIF4G interaction as a strategy to impair coronavirus replication, *J. Virol.*, **85**, 6381-6389, doi: 10.1128/JVI.00078-11.
204. Cao, J., He, L., Lin, G., Hu, C., Dong, R., Zhang, J., Zhu, H., Hu, Y., Wagner, C. R., He, Q., and Yang, B. (2014) Cap-dependent translation initiation factor, eIF4E, is the target for Ouabain-mediated inhibition of HIF-1alpha, *Biochem. Pharmacol.*, **89**, 20-30, doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.002.
205. Huang, C. T., Hsieh, C. H., Oyang, Y. J., Huang, H. C., and Juan, H. F. (2018) A large-scale gene expression intensity-based similarity metric ford repositioning, *iScience*, **7**, 40-52, doi: 10.1016/j.isci.2018.08.017.
206. Perne, A., Muellner, M. K., Steinrueck, M., Craig-Mueller, N., Mayerhofer, J., Schwarzinger, I., Sloane, M., Uras, I. Z., Hoermann, G., Nijman, S. M., and Mayerhofer, M. (2009) Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis, *PloS One*, **4**, e8292, doi: 10.1371/journal.pone.0008292.
207. Hossan, M. S., Chan, Z. Y., Collins, H. M., Shipton, F. N., Butler, M. S., Rahmatullah, M., Lee, J. B., Gershkovich, P., Kagan, L., Khoo, T. J., Wiart, C., and Bradshaw, T. D. (2019) Cardiac glycoside cerberin exerts anticancer activity through PI3K/AKT/mTOR signal transduction inhibition, *Cancer Lett.*, **453**, 57-73, doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.034.
208. Howard, C. M., Estrada, M., Terrero, D., Tiwari, A. K., and Raman, D. (2020) Identification of cardiac glycosides as novel inhibitors of eIF4A1-mediated translation in triple-negative breast cancer cells, *Cancers*, **12**, doi: 10.3390/cancers12082169.
209. Kentsis, A., Topisirovic, I., Culjkovic, B., Shao, L., and Borden, K. L. (2004) Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 18105-18110, doi: 10.1073/pnas.0406927102.
210. Westman, B., Beeren, L., Grudzien, E., Stepinski, J., Worch, R., Zuberek, J., Jemielity, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R. E., and Preiss, T. (2005) The antiviral drug ribavirin does not mimic the 7-methylguanosine moiety of the mRNA cap structure *in vitro*, *RNA*, **11**, 1505-1513, doi: 10.1261/rna.2132505.
211. Yan, Y., Svitkin, Y., Lee, J. M., Bisaillon, M., and Pelletier, J. (2005) Ribavirin is not a functional mimic of the 7-methyl guanosine mRNA cap, *RNA*, **11**, 1238-1244, doi: 10.1261/rna.2930805.
212. Kentsis, A., Volpon, L., Topisirovic, I., Soll, C. E., Culjkovic, B., Shao, L., and Borden, K. L. (2005) Further evidence that ribavirin interacts with eIF4E, *RNA*, **11**, 1762-1766, doi: 10.1261/rna.2238705.
213. Tan, K., Culjkovic, B., Amri, A., and Borden, K. L. (2008) Ribavirin targets eIF4E dependent Akt survival signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 341-345, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.163.
214. Chu, J., and Pelletier, J. (2015) Targeting the eIF4A RNA helicase as an anti-neoplastic approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1849**, 781-791, doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.09.006.
215. Naineni, S. K., Itoua Maiga, R., Cencic, R., Putnam, A. A., Amador, L. A., Rodriguez, A. D., Jankowsky, E., and Pelletier, J. (2020) A comparative study of small molecules targeting eIF4A, *RNA*, **26**, 541-549, doi: 10.1261/rna.072884.119.
216. Cencic, R., and Pelletier, J. (2016) Hippuristanol – a potent steroid inhibitor of eukaryotic initiation factor 4A, *Translation*, **4**, e1137381, doi: 10.1080/21690731.2015.1137381.
217. Bordeleau, M. E., Matthews, J., Wojnar, J. M., Lindqvist, L., Novac, O., Jankowsky, E., Sonenberg, N., Northcote, P., Teesdale-Spittle, P., and Pelletier, J. (2005) Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10460-10465, doi: 10.1073/pnas.0504249102.
218. Low, W. K., Dang, Y., Schneider-Poetsch, T., Shi, Z., Choi, N. S., Merrick, W. C., Romo, D., and Liu, J. O. (2005) Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A, *Mol. Cell*, **20**, 709-722, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.008.
219. Iwasaki, S., Iwasaki, W., Takahashi, M., Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S. N., Fujiwara, K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Fukuzawa, K., Ito, T., and Ingolia, N. T. (2019) The Translation inhibitor rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA, *Mol. Cell*, **73**, 738-748 e739, doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.026.
220. Cencic, R., Carrier, M., Galicia-Vazquez, G., Bordeleau, M. E., Sukarieh, R., Bourdeau, A., Brem, B., Teodoro, J. G., Greger, H., Tremblay, M. L., Porco, J. A., Jr., and Pelletier, J. (2009) Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol, *PloS One*, **4**, e5223, doi: 10.1371/journal.pone.0005223.
221. Chu, J., Zhang, W., Cencic, R., O'Connor, P. B. F., Robert, F., Devine, W. G., Selznick, A., Henkel, T., Merrick, W. C., Brown, L. E., Baranov, P. V., Porco, J. A., Jr., and Pelletier, J. (2020) Rocaglates induce gain-of-function alterations to eIF4A and eIF4F, *Cell Rep.*, **30**, 2481-2488 e2485, doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.002.
222. Low, W. K., Li, J., Zhu, M., Kommaraju, S. S., Shah-Mittal, J., Hull, K., Liu, J. O., and Romo, D. (2014) Second-generation derivatives of the eukaryotic translation initiation inhibitor pateamine A targeting eIF4A as potential anticancer agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 116-125, doi: 10.1016/j.bmc.2013.11.046.
223. Tillotson, J., Kedzior, M., Guimaraes, L., Ross, A. B., Peters, T. L., Ambrose, A. J., Schmidlin, C. J., Zhang, D. D., Costa-Lotufo, L. V., Rodriguez, A. D., Schatz, J. H., and Chapman, E. (2017) ATP-competitive, marine derived natural products that target the DEAD box helicase,

eIF4A, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 4082-4085, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.07.045.
224. Stewart, M. L., Grollman, A. P., and Huang, M. T. (1971) Aurintricarboxylic acid: inhibitor of initiation of protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 97-101, doi: 10.1073/pnas.68.1.97.
225. Huang, M. T., and Grollman, A. P. (1973) Pyrocatechol violet: an inhibitor of initiation of protein synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1049-1059, doi: 10.1016/0006-291x(73)90571-8.
226. Gonzalez, R. G., Blackburn, B. J., and Schleich, T. (1979) Fractionation and structural elucidation of the active components of aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein nucleic acid interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 534-545, doi: 10.1016/0005-2787(79)90116-3.
227. Liao, L. L., Horwitz, S. B., Huang, M. T., Grollman, A. P., Steward, D., and Martin, J. (1975) Triphenylmethane dyes as inhibitors of reverse transcriptase, ribonucleic acid polymerase, and protein synthesis. Structure-activity relationships, *J. Med. Chem.*, **18**, 117-120, doi: 10.1021/jm00235a029.
228. Leader, D. P. (1972) Aurintricarboxylic acid inhibition of the binding of phenylalanyl-tRNAa to rat liver ribosomal subunits, *FEBS Lett.*, **22**, 245-248, doi: 10.1016/0014-5793(72)80055-3.
229. Contreras, A., Vazquez, D., and Carrasco, L. (1978) Inhibition, by selected antibiotics, of protein synthesis in cells growing in tissue cultures, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **31**, 598-602, doi: 10.7164/antibiotics.31.598.
230. Novac, O., Guenier, A. S., and Pelletier, J. (2004) Inhibitors of protein synthesis identified by a high throughput multiplexed translation screen, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 902-915, doi: 10.1093/nar/gkh235.
231. Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Shatsky, I. N. (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 836-841, doi: 10.1038/nsmb.1445.
232. Robert, F., Kapp, L. D., Khan, S. N., Acker, M. G., Kolitz, S., Kazemi, S., Kaufman, R. J., Merrick, W. C., Koromilas, A. E., Lorsch, J. R., and Pelletier, J. (2006) Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4632-4644, doi: 10.1091/mbc.e06-06-0478.
233. Carvalho, A., Chu, J., Meinguet, C., Kiss, R., Vandenbussche, G., Masereel, B., Wouters, J., Kornienko, A., Pelletier, J., and Mathieu, V. (2017) A harmine-derived beta-carboline displays anti-cancer effects in vitro by targeting protein synthesis, *Eur. J. Pharmacol.*, **805**, 25-35, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.034.
234. Lee, J., Kang, S. U., Kang, M. K., Chun, M. W., Jo, Y. J., Kwak, J. H., and Kim, S. (1999) Methionyl adenylate analogues as inhibitors of methionyl-tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1365-1370, doi: 10.1016/s0960-894x(99)00206-1.
235. Lee, J., Kang, M. K., Chun, M. W., Jo, Y. J., Kwak, J. H., and Kim, S. (1998) Methionine analogues as inhibitors of methionyl-tRNA synthetase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 3511-3514, doi: 10.1016/s0960-894x(98)00642-8.
236. Nevinsky, G. A., Favorova, O. O., Lavrik, O. I., Petrova, T. D., Kochkina, L. L., and Savchenko, T. I. (1974) Fluorinated tryptophans as substrates and inhibitors of the ATP—(32P)PPi exchange reaction catalysed by tryptophanyl tRNA synthetase, *FEBS Lett.*, **43**, 135-138, doi: 10.1016/0014-5793(74)80985-3.
237. Zhao, Y., Meng, Q., Bai, L., and Zhou, H. (2014) *In silico* discovery of aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 1358-1373, doi: 10.3390/ijms15011358.
238. Lux, M. C., Standke, L. C., and Tan, D. S. (2019) Targeting adenylate-forming enzymes with designed sulfonyladenosine inhibitors, *J. Antibiot. (Tokyo)*, **72**, 325-349, doi: 10.1038/s41429-019-0171-2.
239. Francklyn, C. S., and Mullen, P. (2019) Progress and challenges in aminoacyl-tRNA synthetase-based therapeutics, *J. Biol. Chem.*, **294**, 5365-5385, doi: 10.1074/jbc.REV118.002956.
240. Alix, J. H. (1982) Molecular aspects of the *in vivo* and *in vitro* effects of ethionine, an analog of methionine, *Microbiol. Rev.*, **46**, 281-295.
241. Fang, P., Yu, X., Jeong, S. J., Mirando, A., Chen, K., Chen, X., Kim, S., Francklyn, C. S., and Guo, M. (2015) Structural basis for full-spectrum inhibition of translational functions on a tRNA synthetase, *Nat. Commun.*, **6**, 6402, doi: 10.1038/ncomms7402.
242. el Khoury, A., and Atoui, A. (2010) Ochratoxin a: general overview and actual molecular status, *Toxins*, **2**, 461-493, doi: 10.3390/toxins2040461.
243. Keller, T. L., Zocco, D., Sundrud, M. S., Hendrick, M., Edenius, M., Yum, J., Kim, Y. J., Lee, H. K., Cortese, J. F., Wirth, D. F., Dignam, J. D., Rao, A., Yeo, C. Y., Mazitschek, R., and Whitman, M. (2012) Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 311-317, doi: 10.1038/nchembio.790.
244. Sundrud, M. S., Koralov, S. B., Feuerer, M., Calado, D. P., Kozhaya, A. E., Rhule-Smith, A., Lefebvre, R. E., Unutmaz, D., Mazitschek, R., Waldner, H., Whitman, M., Keller, T., and Rao, A. (2009) Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response, *Science*, **324**, 1334-1338, doi: 10.1126/science.1172638.
245. Sarkar, J., Mao, W., Lincecum, T. L., Jr., Alley, M. R., and Martinis, S. A. (2011) Characterization of benzoxaborole-based antifungal resistance mutations demonstrates that editing depends on electrostatic stabilization of the leucyl-tRNA synthetase editing cap, *FEBS Lett.*, **585**, 2986-2991, doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.010.
246. Marjanovic, J., and Kozmin, S. A. (2007) Spirofungin A: stereoselective synthesis and inhibition of isoleucyl-tRNA synthetase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 8854-8857, doi: 10.1002/anie.200702440.
247. Shimizu, T., Usui, T., Machida, K., Furuya, K., Osada, H., and Nakata, T. (2002) Chemical modification of reveromycin A and its biological activities, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3363-3366, doi: 10.1016/s0960-894x(02)00782-5.
248. Miyamoto, Y., Machida, K., Mizunuma, M., Emoto, Y., Sato, N., Miyahara, K., Hirata, D., Usui, T., Takahashi, H., Osada, H., and Miyakawa, T. (2002) Identification of Saccharomyces cerevisiae isoleucyl-tRNA synthetase as a target of the G1-specific inhibitor Reveromycin A, *J. Biol. Chem.*, **277**, 28810-28814, doi: 10.1074/jbc.M203827200.
249. Woo, J. T., Kawatani, M., Kato, M., Shinki, T., Yonezawa, T., Kanoh, N., Nakagawa, H., Takami, M., Lee, K. H., Stern, P. H., Nagai, K., and Osada, H. (2006) Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4729-4734, doi: 10.1073/pnas.0505663103.
250. Kirillov, S., Vitali, L. A., Goldstein, B. P., Monti, F., Semenkov, Y., Makhno, V., Ripa, S., Pon, C. L., and Gualerzi, C. O. (1997) Purpuromycin: an antibiotic inhibiting tRNA aminoacylation, *RNA*, **3**, 905-913.
251. Van de Vijver, P., Ostrowski, T., Sproat, B., Goebels, J., Rutgeerts, O., Van Aerschot, A., Waer, M., and Herdewijn, P. (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potent and synergistic immunosuppressants, *J. Med. Chem.*, **51**, 3020-3029, doi: 10.1021/jm8000746.

252. Kim, Y., Sundrud, M. S., Zhou, C., Edenius, M., Zocco, D., Powers, K., Zhang, M., Mazitschek, R., Rao, A., Yeo, C. Y., Noss, E. H., Brenner, M. B., Whitman, M., and Keller, T. L. (2020) Aminoacyl-tRNA synthetase inhibition activates a pathway that branches from the canonical amino acid response in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 8900-8911, doi: 10.1073/pnas.1913788117.
253. Proud, C. G. (2019) Phosphorylation and Signal Transduction Pathways in Translational Control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, a033050, doi: 10.1101/cshperspect.a033050.
254. Roux, P. P., and Topisirovic, I. (2012) Regulation of mRNA translation by signaling pathways, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a012252, doi: 10.1101/cshperspect.a012252.
255. Thoreen, C. C. (2017) The molecular basis of mTORC1-regulated translation, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 213-221, doi: 10.1042/BST20160072.
256. Siddiqui, N., and Sonenberg, N. (2015) Signalling to eIF4E in cancer, *Biochemical Soc. Trans.*, **43**, 763-772, doi: 10.1042/BST20150126.
257. Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., Loughran, G., Terenin, I. M., Baranov, P. V., and Shatsky, I. N. (2018) Translation control of mRNAs encoding mammalian translation initiation factors, *Gene*, **651**, 174-182, doi: 10.1016/j.gene.2018.02.013.
258. Cockman, E., Anderson, P., and Ivanov, P. (2020) TOP mRNPs: molecular mechanisms and principles of regulation, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10070969.
259. Hua, H., Kong, Q., Zhang, H., Wang, J., Luo, T., and Jiang, Y. (2019) Targeting mTOR for cancer therapy, *J. Hematol. Oncol.*, **12**, 71, doi: 10.1186/s13045-019-0754-1.
260. Anisimova, A. S., Meerson, M. B., Gerashchenko, M. V., Kulakovskiy, I. V., Dmitriev, S. E., and Gladyshev, V. N. (2020) Multifaceted deregulation of gene expression and protein synthesis with age, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 15581-15590, doi: 10.1073/pnas.2001788117.
261. Anisimova, A. S., Alexandrov, A. I., Makarova, N. E., Gladyshev, V. N., and Dmitriev, S. E. (2018) Protein synthesis and quality control in aging, *Aging*, **10**, 4269-4288, doi: 10.18632/aging.101721.
262. Schenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., Radi, M., and Botta, M. (2011) ATP-competitive inhibitors of mTOR: an update, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 2995-3014, doi: 10.2174/092986711796391651.
263. Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J. C., Jr., and Abraham, R. T. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, *EMBO J.*, **15**, 5256-5267.
264. Li, B. B., Qian, C., Gameiro, P. A., Liu, C. C., Jiang, T., Roberts, T. M., Struhl, K., and Zhao, J. J. (2018) Targeted profiling of RNA translation reveals mTOR-4EBP1/2-independent translation regulation of mRNAs encoding ribosomal proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E9325-E9332, doi: 10.1073/pnas.1805782115.
265. Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., and Samali, A. (2013) The eIF2alpha kinases: their structures and functions, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 3493-3511, doi: 10.1007/s00018-012-1252-6.
266. Wek, R. C. (2018) Role of eIF2alpha kinases in translational control and adaptation to cellular stress, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a032870.
267. Akulich, K. A., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Anisimova, A. S., Makeeva, D. S., Arkhipova, V. I., Stolboushkina, E. A., Garber, M. B., Prokofjeva, M. M., Spirin, P. V., Prassolov, V. S., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2016) Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes, *Sci. Rep.*, **6**, 37905, doi: 10.1038/srep37905.
268. Joshi, M., Kulkarni, A., and Pal, J. K. (2013) Small molecule modulators of eukaryotic initiation factor 2alpha kinases, the key regulators of protein synthesis, *Biochimie*, **95**, 1980-1990, doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.030.
269. Chen, T., Ozel, D., Qiao, Y., Harbinski, F., Chen, L., Denoyelle, S., He, X., Zvereva, N., Supko, J. G., Chorev, M., Halperin, J. A., and Aktas, B. H. (2011) Chemical genetics identify eIF2alpha kinase heme-regulated inhibitor as an anticancer target, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 610-616, doi: 10.1038/nchembio.613.
270. Ganz, J., Shacham, T., Kramer, M., Shenkman, M., Eiger, H., Weinberg, N., Iancovici, O., Roy, S., Simhaev, L., Da'adoosh, B., Engel, H., Perets, N., Barhum, Y., Portnoy, M., Offen, D., and Lederkremer, G. Z. (2020) A novel specific PERK activator reduces toxicity and extends survival in Huntington's disease models, *Sci. Rep.*, **10**, 6875, doi: 10.1038/s41598-020-63899-4.
271. Stockwell, S. R., Platt, G., Barrie, S. E., Zoumpoulidou, G., Te Poele, R. H., Aherne, G. W., Wilson, S. C., Sheldrake, P., McDonald, E., Venet, M., Soudy, C., Elustondo, F., Rigoreau, L., Blagg, J., Workman, P., Garrett, M. D., and Mittnacht, S. (2012) Mechanism-based screen for G1/S checkpoint activators identifies a selective activator of EIF2AK3/PERK signalling, *PloS One*, **7**, e28568, doi: 10.1371/journal.pone.0028568.
272. Damgaard, C. K., and Lykke-Andersen, J. (2011) Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR, *Genes Dev.*, **25**, 2057-2068, doi: 10.1101/gad.17355911.
273. Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., Krnjevic, K., Lacaille, J. C., Nader, K., and Sonenberg, N. (2007) eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory, *Cell*, **129**, 195-206, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.050.
274. Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ma, D., Coen, D. M., Ron, D., and Yuan, J. (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress, *Science*, **307**, 935-939, doi: 10.1126/science.1101902.
275. Kim, S. M., Yoon, S. Y., Choi, J. E., Park, J. S., Choi, J. M., Nguyen, T., and Kim, D. H. (2010) Activation of eukaryotic initiation factor-2 alpha-kinases in okadaic acid-treated neurons, *Neuroscience*, **169**, 1831-1839, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.016.
276. Wakula, P., Beullens, M., van Eynde, A., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Bollen, M. (2006) The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1, *Biochem. J.*, **400**, 377-383, doi: 10.1042/BJ20060758.
277. Kolupaeva, V. (2019) Serine-threonine protein phosphatases: Lost in translation, *Biochim. Biophys. Acta*, *Mol. Cell Res.*, **1866**, 83-89, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.006.
278. Sidrauski, C., Acosta-Alvear, D., Khoutorsky, A., Vedantham, P., Hearn, B. R., Li, H., Gamache, K., Gallagher, C. M., Ang, K. K., Wilson, C., Okreglak, V., Ashkenazi, A., Hann, B., Nader, K., Arkin, M. R., Renslo, A. R., Sonenberg, N., and Walter, P. (2013) Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory, *eLife*, **2**, e00498, doi: 10.7554/eLife.00498.
279. Rabouw, H. H., Langereis, M. A., Anand, A. A., Visser, L. J., de Groot, R. J., Walter, P., and van Kuppeveld, F. J. M. (2019) Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2097-2102, doi: 10.1073/pnas.1815767116.

280. Chen, Z., Gopalakrishnan, S. M., Bui, M. H., Soni, N. B., Warrior, U., Johnson, E. F., Donnelly, J. B., and Glaser, K. B. (2011) 1-Benzyl-3-cetyl-2-methylimidazolium iodide (NH125) induces phosphorylation of eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): a cautionary note on the anticancer mechanism of an eEF2 kinase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **286**, 43951-43958, doi: 10.1074/jbc.M111.301291.
281. De Gassart, A., Demaria, O., Panes, R., Zaffalon, L., Ryazanov, A. G., Gilliet, M., and Martinon, F. (2016) Pharmacological eEF2K activation promotes cell death and inhibits cancer progression, *EMBO Rep.*, **17**, 1471-1484, doi: 10.15252/embr.201642194.
282. Devkota, A. K., Tavares, C. D., Warthaka, M., Abramczyk, O., Marshall, K. D., Kaoud, T. S., Gorgulu, K., Ozpolat, B., and Dalby, K. N. (2012) Investigating the kinetic mechanism of inhibition of elongation factor 2 kinase by NH125: evidence of a common in vitro artifact, *Biochemistry*, **51**, 2100-2112, doi: 10.1021/bi201787p.
283. Beretta, S., Gritti, L., Verpelli, C., and Sala, C. (2020) Eukaryotic elongation factor 2 kinase a pharmacological target to regulate protein translation dysfunction in neurological diseases, *Neuroscience*, **445**, 42-49, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.015.
284. Niederberger, E., King, T. S., Russe, O. Q., and Geisslinger, G. (2015) Activation of AMPK and its impact on exercise capacity, *Sports Med.*, **45**, 1497-1509, doi: 10.1007/s40279-015-0366-z.
285. Johanns, M., Pyr Dit Ruys, S., Houddane, A., Vertommen, D., Herinckx, G., Hue, L., Proud, C. G., and Rider, M. H. (2017) Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase, *Cell. Signal.*, **36**, 212-221, doi: 10.1016/j.cellsig.2017.05.010.
286. Sitron, C. S., and Brandman, O. (2020) Detection and degradation of stalled nascent chains via ribosome-associated quality control, *Annu. Rev. Biochem.*, **89**, 417-442, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-110729.
287. Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., Dinh, T. H., Pearson, J. A., Chen, S. L., and Magun, B. E. (1997) Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3373-3381, doi: 10.1128/mcb.17.6.3373.
288. Shifrin, V. I., and Anderson, P. (1999) Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun *N*-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **274**, 13985-13992, doi: 10.1074/jbc.274.20.13985.
289. He, K., Zhou, H. R., and Pestka, J. J. (2012) Targets and intracellular signaling mechanisms for deoxynivalenol-induced ribosomal RNA cleavage, *Toxicol. Sci.*, **127**, 382-390, doi: 10.1093/toxsci/kfs134.
290. He, K., Zhou, H. R., and Pestka, J. J. (2012) Mechanisms for ribotoxin-induced ribosomal RNA cleavage, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **265**, 10-18, doi: 10.1016/j.taap.2012.09.017.
291. Yang, G. H., Jarvis, B. B., Chung, Y. J., and Pestka, J. J. (2000) Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **164**, 149-160, doi: 10.1006/taap.1999.8888.
292. Li, M., and Pestka, J. J. (2008) Comparative induction of 28S ribosomal RNA cleavage by ricin and the trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin in the macrophage, *Toxicol. Sci.*, **105**, 67-78, doi: 10.1093/toxsci/kfn111.
293. Lee, K. H., Nishimura, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Ichijo, H., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2006) Induction of a ribotoxic stress response that stimulates stress-activated protein kinases by 13-deoxytedanolide, an antitumor marine macrolide, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 161-171, doi: 10.1271/bbb.70.161.
294. Vind, A. C., Snieckute, G., Blasius, M., Tiedje, C., Krogh, N., Bekker-Jensen, D. B., Andersen, K. L., Nordgaard, C., Tollenaere, M. A. X., Lund, A. H., Olsen, J. V., Nielsen, H., and Bekker-Jensen, S. (2020) ZAKalpha recognizes stalled ribosomes through partially redundant sensor domains, *Mol. Cell*, **78**, 700-713 e707, doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.021.
295. Yamada, Y., Taketani, S., Osada, H., and Kataoka, T. (2011) Cytotrienin A, a translation inhibitor that induces ectodomain shedding of TNF receptor 1 via activation of ERK and p38 MAP kinase, *Eur. J. Pharmacol.*, **667**, 113-119, doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.072.
296. Francis, S. P., Katz, J., Fanning, K. D., Harris, K. A., Nicholas, B. D., Lacy, M., Pagana, J., Agris, P. F., and Shin, J. B. (2013) A novel role of cytosolic protein synthesis inhibition in aminoglycoside ototoxicity, *J. Neurosci.*, **33**, 3079-3093, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3430-12.2013.
297. Jandhyala, D. M., Ahluwalia, A., Obrig, T., and Thorpe, C. M. (2008) ZAK: a MAP3Kinase that transduces Shiga toxin- and ricin-induced proinflammatory cytokine expression, *Cell. Microbiol.*, **10**, 1468-1477, doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01139.x.
298. Wang, X., Mader, M. M., Toth, J. E., Yu, X., Jin, N., Campbell, R. M., Smallwood, J. K., Christe, M. E., Chatterjee, A., Goodson, T., Jr., Vlahos, C. J., Matter, W. F., and Bloem, L. J. (2005) Complete inhibition of anisomycin and UV radiation but not cytokine induced JNK and p38 activation by an aryl-substituted dihydropyrrolopyrazole quinoline and mixed lineage kinase 7 small interfering RNA, *J. Biol. Chem.*, **280**, 19298-19305, doi: 10.1074/jbc.M413059200.
299. Sauter, K. A., Magun, E. A., Iordanov, M. S., and Magun, B. E. (2010) ZAK is required for doxorubicin, a novel ribotoxic stressor, to induce SAPK activation and apoptosis in HaCaT cells, *Cancer Biol. Ther.*, **10**, 258-266, doi: 10.4161/cbt.10.3.12367.
300. Wolfson, R. L., and Sabatini, D. M. (2017) The dawn of the age of amino acid sensors for the mTORC1 pathway, *Cell Metab.*, **26**, 301-309, doi 10.1016/j.cmet.2017.07.001.
301. Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015) Targeting the translation machinery in cancer, *Nat. rev. Drug Discov.*, **14**, 261-278, doi: 10.1038/nrd4505.
302. Gilles, A., Frechin, L., Natchiar, K., Biondani, G., Loeffelholz, O. V., Holvec, S., Malaval, J. L., Winum, J. Y., Klaholz, B. P., and Peyron, J. F. (2020) Targeting the human 80S ribosome in cancer: from structure to function and drug design for innovative adjuvant therapeutic strategies, *Cells*, **9**, 629, doi: 10.3390/cells9030629.
303. Osterman, I. A., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., and Sergiev, P. V. (2016) Techniques for screening translation inhibitors, *Antibiotics*, **5**, 22, doi: 10.3390/antibiotics5030022.
304. Ivanenkov, Y. A., Zhavoronkov, A., Yamidanov, R. S., Osterman, I. A., Sergiev, P. V., Aladinskiy, V. A., Aladinskaya, A. V., Terentiev, V. A., Veselov, M. S., Ayginin, A. A., Kartsev, V. G., Skvortsov, D. A., Chemeris, A. V., Baimiev, A. K., Sofronova, A. A., Malyshev, A. S., Filkov, G. I., Bezrukov, D. S., Zagribelnyy, B. A., Putin, E. O., et al. (2019) Identification of novel antibacterials using machine learning techniques, *Front. Pharmacol.*, **10**, 913, doi: 10.3389/fphar.2019.00913.
305. Blanchard, S. C., Cooperman, B. S., and Wilson, D. N. (2010) Probing translation with small-molecule inhibitors, *Chem. Biol.*, **17**, 633-645, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.06.003.

A QUICK GUIDE TO SMALL-MOLECULE INHIBITORS OF EUKARYOTIC PROTEIN SYNTHESIS*

Review

S. E. Dmitriev[1,2,3], D. O. Vladimirov[2], and K. A. Lashkevich[1]**

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru*

[2] *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

[3] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

Received August 26, 2020
Revised October 04, 2020
Accepted October 04, 2020

The eukaryotic ribosome and cap-dependent translation machinery are attractive targets for antitumor, antiviral, anti-inflammatory, and antiparasitic therapies. A wide range of small molecule drugs specifically inhibiting protein biosynthesis in eukaryotic cells is currently known. A large number of such compounds are found among the well-studied ribosome-targeting antibiotics, which include drugs inhibiting translocation, blocking the peptidyltransferase center or the ribosomal peptide tunnel, inducing miscoding, premature termination and stop codon readthrough, or modulating ribosomal binding of translation machinery components. Small molecule inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases, translation factors, and translation associated signaling pathways, including mTOR kinase, are also in focus. Ribosome-targeting inhibitors are widely used in gene expression analysis by ribosome profiling, in cell culture techniques, as fungicides in agriculture, as anthelmintic and antifungal agents in medicine. Substances that affect the accuracy of stop codon recognition are promising drugs for nonsense-suppression therapy of hereditary diseases and for restoring the function of tumor suppressors in cancer cells. Some translation inhibitors have geroprotective properties. In this review, we present a list of both well-studied and less well known inhibitors of eukaryotic protein synthesis (with the exception of translation in mitochondria and plastids), supplemented by information on their direct targets and a brief description of their mechanisms of action. We also present a continuously updated database, currently containing information on 370 compounds inhibiting eukaryotic protein synthesis: http://eupsic.belozersky.msu.ru/.

Keywords: small molecular drugs, 40S and 60S ribosomal subunits, 4E-BP1, eIF2 phosphorylation, ribotoxic stress, cycloheximide, harringtonine, trichothecene mycotoxins, aminoglycosides, rapamycin

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1676 – 1689

УДК 577.052.2

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ЭЛОНГАЦИИ

Обзор

© 2020 Е.В. Полесскова, М.Ю. Каюмов, С.В. Кириллов, А.Л. Коневега*

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300 Гатчина, Ленинградская обл., Россия; электронная почта: konevega_al@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 05.07.2020
После доработки 01.08.2020
Принята к публикации 01.08.2020

Трансляционные ГТФазы (трГТФазы), относящиеся к классу G-белков, играют ключевую роль на всех этапах биосинтеза белка на рибосоме. Однонаправленность и цикличность функционирования G-белков обеспечивается возможностью их переключения между активным и неактивным состояниями вследствие гидролиза ГТФ, ускоряемого вспомогательными белками-стимуляторами ГТФазной активности. Несмотря на то что трГТФазы взаимодействуют с рибосомами, находящимися в разных конформационных состояниях, для активации они связываются с одной и той же консервативной областью, которая, в отличие от классических белков-стимуляторов ГТФазной активности, представлена РНК. В результате у всех факторов элонгации образуется практически одинаковая структура активного каталитического центра, предполагающая единый механизм реакции гидролиза ГТФ. Однако нюансы в процессе формирования активированного состояния, а также существенно отличающаяся скорость реакции гидролиза ГТФ указывают на существование особенностей при реализации гидролитической функции разными факторами элонгации. В данной работе представлено современное видение механизмов регулирования ГТФазной активности факторов элонгации EF-Tu, EF-G и SelB и гидролиза ГТФ, основанное на анализе структурных, биохимических и биоинформатических данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: факторы элонгации, трансляция, гидролиз ГТФ, EF-Tu, EF-G, SelB, рибосома.

DOI: 10.31857/S032097252011010X

ВВЕДЕНИЕ

Гидролиз ГТФ является ключевой реакцией на всех этапах биосинтеза белка [1, 2]. На рибосоме эта реакция катализируется филогенетически связанными белковыми факторами, трансляционными ГТФазами (трГТФазами), представителями семейства которых являются бактериальные факторы EF-Tu, EF-G, IF2, RF3, LepA, SelB и их гомологи у архей и эукариот, а также некоторые другие белки [3]. Это семейство, в свою очередь, входит в состав суперсемейства ГТФ-гидролизующих белков или G-белков, являющихся регуляторными молекулярными переключателями, которые циркулируют между активным ГТФ-связанным и неактивным ГДФ-связанным состояниями [4–6]. Переходы между этими двумя конформациями регулируются гидролизом ГТФ, который в ряде случаев может ускоряться с помощью вспомогательных белков, стимулирующих ГТФазную активность G-белков [5, 6].

Несмотря на различия в аминокислотной последовательности, структура Ras-подобного нуклеотид-связывающего G-домена схожа у всех ГТФаз. В его состав входят пять консервативных областей, которые обеспечивают взаимодействие с гуаниновым нуклеотидом [7, 8]. G1 область – фосфат-связывающая петля (P-петля) – связывает α- и β-фосфаты гуанинового нуклеотида. G2 и G3 области – регионы switch I и switch II – взаимодействуют с γ-фосфатом, белками-стимуляторами ГТФазной активности и претерпевают значительные конформационные изменения при гидролизе ГТФ [9]. G4 и G5 отвечают за связывание гуанинового основания, обеспечивая субстратную специфичность.

Многолетние биохимические, генетические и структурные исследования позволили иденти-

Принятые сокращения: трГТФазы – трансляционные ГТФазы; СРП – сарцин-рициновая петля; GTPγS – гуанозин-5′-O-[γ-тио]трифосфат; PDB – Protein Data Bank; ID – идентификационный код; Sec – селеноцистеин, 21-я протеиногенная аминокислота; SECIS – Sec Insertion Sequence; аа-тРНК – аминоацил-тРНК.

* Адресат для корреспонденции.

фицировать ключевые элементы, входящие в состав каталитического центра трГТФаз. На конце региона switch II после глицинового остатка консервативного мотива DXXG находится остаток инвариантного для трГТФаз гистидина – His84 (нумерация а.о. трГТФаз здесь и далее по тексту приводится в соответствии с последовательностью EF-Tu из *Escherichia coli*, если не указано иное) [4, 10]. Замена этого остатка гистидина в факторах элонгации EF-Tu и EF-G на другие а.о. приводит к ингибированию стимулированной рибосомой реакции гидролиза ГТФ [11–16]. В структурных работах, визуализирующих рибосомные комплексы, содержащие элонгационные факторы EF-Tu, EF-G и SelB в активированном состоянии, остатки гистидина обнаруживаются в схожих конформациях, направленных на γ-фосфат ГТФ через так называемые «гидрофобные ворота» [17–23]. Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа комплекса EF-Tu с аналогом ГТФ β-γ-метиленгуанозин-5′-трифосфатом (GDPCP) и рибосомой, было предложено, что His84 действует как каталитический остаток, который депротонирует молекулу воды для атаки на связь между β- и γ-фосфатами ГТФ [17]. Были также представлены и альтернативные механизмы, в которых His84 играет стабилизирующую роль для воды, выступающей в роли нуклеофила [24, 25]. Дополнительная координация этой молекулы воды осуществляется за счёт водородных связей с остатками Thr61 из региона switch I и глицина Gly83 из региона switch II, находящихся в непосредственной близости от γ-фосфата ГТФ (рис. 1) [17, 20, 26]. Помимо регионов switch I и switch II в позиционировании гуанинового нуклеотида внутри фактора участвуют а.о. P-петли. К ним относится остаток аспарагиновой кислоты Asp21 и универсально консервативная последовательность GKT, существующая не только в трГТФазах, но и во всех G-белках [27]. Asp21 занимает крайне важное положение – он координирует вторую молекулу воды над γ-фосфатом ГТФ в EF-G [19] и образует водородные связи с кислородом, расположенным между β- и γ-фосфатами в EF-Tu [17] и немостиковыми кислородами этих фосфатов в SelB [20]. Атомы кислорода β- и γ-фосфатов дополнительно координируются ионом Mg^{2+}, который, по-видимому, также помогает ГТФ принять правильную конформацию для осуществления гидролиза [17]. Ещё один ион Mg^{2+} находится в положении, связывающем Asp P-петли и остаток A2662 консервативной области большой субъединицы рибосомы сарцин-рициновой петли (СРП) в ассоциированных с рибосомой комплексах SelB и EF-G [19, 20]. С остатками именно этой области рибосомы взаимодействует и инвариантный His84, предположительно выполняющий каталитическую роль [17, 22]. Анализ структурных и биохимических данных показал, что СРП выступает не только в роли платформы для эффективного связывания трГТФаз с рибосомой [28, 29], но и участвует в регулировании их ГТФазной активности [28, 30, 31]. Это позволяет предположить, что, в отличие от множества G-белков, для запуска эффективного гидролиза ГТФ которых необходимы белки, стимулирующие их ГТФазную активность [7, 8], трГТФазы взаимодействуют с РНК рибосомы, обеспечивающей катализ или конформационные перегруппировки трГТФаз, необходимые для реакции гидролиза ГТФ [30, 31].

Анализ структурных данных выявил, что консервативный остаток гистидина взаимодействует с кислородом фосфатной группы A2662 не только в случае EF-Tu [17, 22, 32], но и в факторе EF-G [19, 26, 33]. В результате появилась гипотеза об универсальном механизме, при реализации которого A2662 СРП переориентирует остаток His84 по сравнению с его положением в не связанном с рибосомой факторе таким образом, что остаток His84 может координировать молекулу воды для атаки на γ-фосфат ГТФ. Позиционирование боковой цепи остатка His84 в ГТФазном центре может приводить к повышению значения его константы диссоциации (pK_a) вследствие локализации нескольких отрицательных зарядов в непосредственной близости [34]. Это могло бы быть дополнительным подтверждением того, что остаток His84 действует как каталитическое основание для отрыва протона и активации воды, выступающей в роли нуклеофила для реакции гидролиза ГТФ на рибосоме (рис. 2, *а*) [17]. Для реализации такого механизма молекула воды, быстро протонирующая His84, должна оставаться в ГТФазном центре в виде гидроксид-иона вблизи отрицательно заряженного γ-фосфата достаточно долго для того, чтобы произошла относительно медленная нуклеофильная атака. Однако из-за сильного электростатического отталкивания связывание гидроксид-иона с γ-фосфатом, вероятно, будет очень нестабильным [35], и с высокой вероятностью гидроксид-ион будет замещен на молекулу воды-растворителя в более короткие сроки, чем произойдет реакция гидролиза ГТФ [25].

Молекула воды, скорее всего, ориентирована таким образом, что ее атомы водорода направлены в сторону от His84 и образуют водородные связи с карбонильным кислородом Thr61 и одним из атомов кислорода γ-фосфата, учитывая небольшое расстояние между нуклеофильной молекулой воды и фосфатом. При этом тес-

ный контакт между водой и ND1 His84 указывает на то, что остаток гистидина, находясь в протонированной форме, образует водородную связь с кислородом молекулы воды, тогда как азот другой боковой цепи образует водородную связь с фосфатной группой A2662 [25].

Более того, изучение зависимости гидролитической активности EF-Tu на рибосоме от pH не обнаружило таковой в диапазоне pH 6,0–8,5, что служит аргументом против механизма, при котором His84 выступает в качестве каталитического основания в этом диапазоне значений pH [11, 12]. Причем похожие результаты были получены как для реакции гидролиза ГТФ, так и в случае использования аналога ГТФ гуанозин-5′-O-[γ-тио]трифосфата (GTPγS), что подчеркивает корректность использования этого аналога ГТФ в данной реакции. Примечательно, что конформационные изменения в SelB, индуцируемые взаимодействием с GTPγS, в значитель-

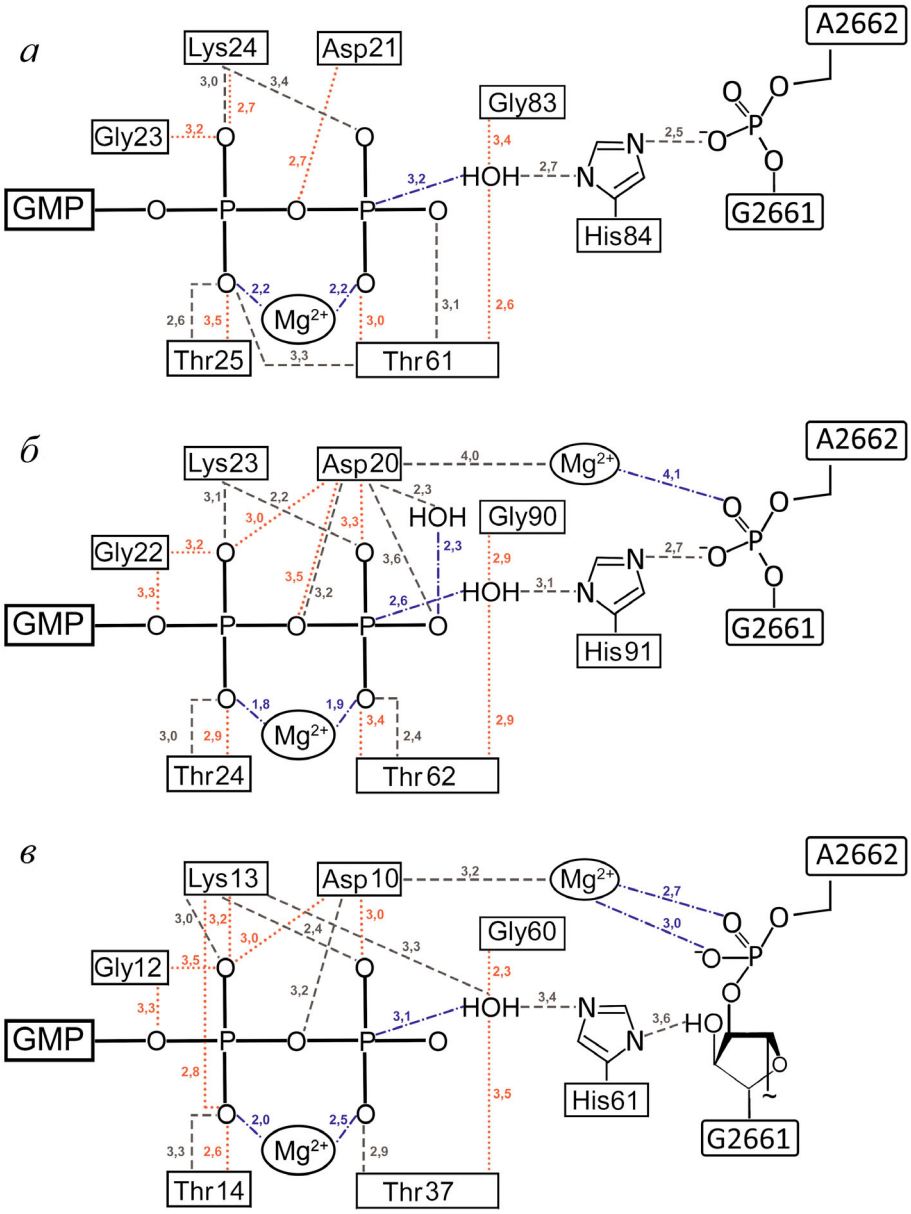


Рис. 1. Схематическое изображение активированного рибосомой нуклеотид-связывающего сайта EF-Tu (Protein Data Bank (PDB) идентификационный (ID) код 4v5l [17]) (*а*), EF-G (PDB ID код 4v9h [19]) (*б*) и SelB (PDB ID код 5lzd [20]) (*в*) с заменой аналогов ГТФ на ГТФ. Взаимодействия боковой группы а.о. (– –), пептидного остова а.о. (· · ·), прочие взаимодействия (– · –). Расстояния указаны в Å. Нумерация в соответствии с последовательностью аминокислот в элонгационных факторах из *E. coli*. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

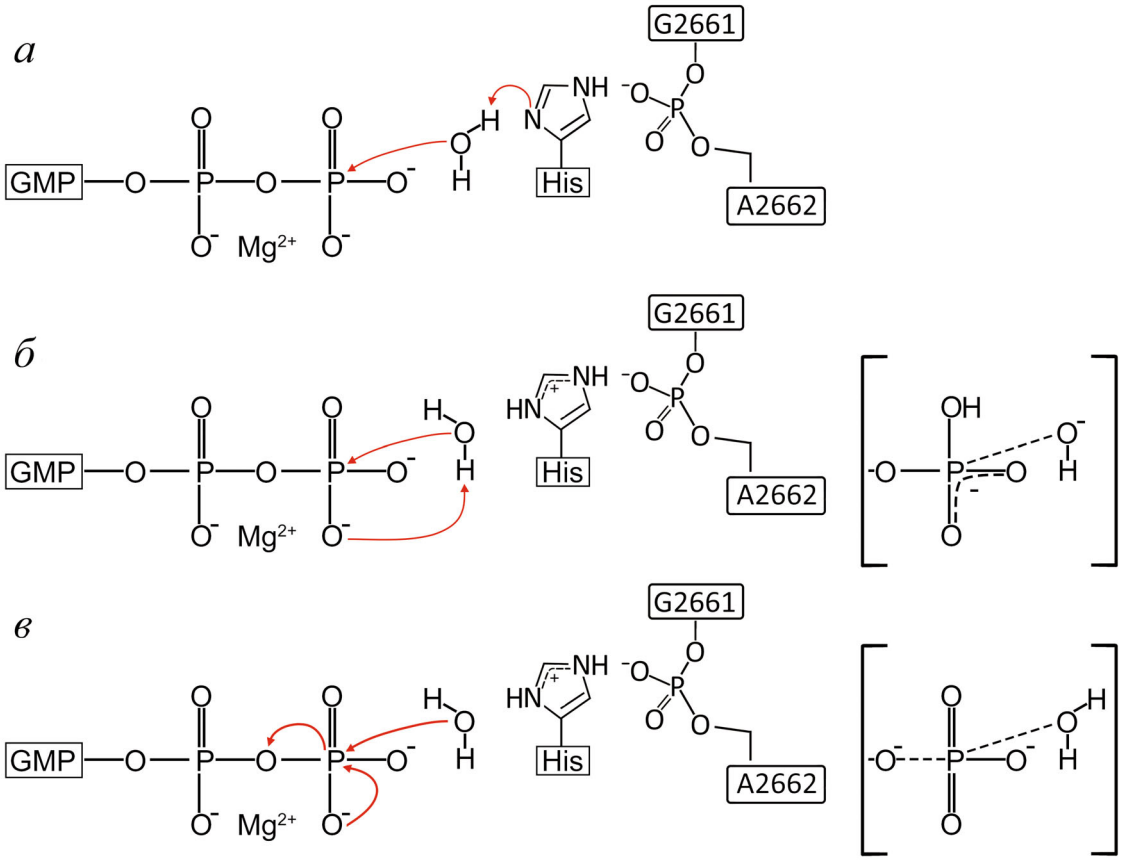


Рис. 2. Возможные механизмы реакции гидролиза ГТФ, соответствующие His84, выступающему в роли каталитического основания (*а*), ассоциативному (*б*) и диссоциативному (*в*) вариантам. Переходные состояния ассоциативного и диссоциативного вариантов указаны структурами в скобках

ной степени соответствовали таковым в присутствии ГТФ [36]. Напротив, комплекс с другим аналогом ГТФ, 5′-гуанилил-имидодифосфатом (GDPNP), больше напоминал неактивную конформацию белка SelB–ГДФ [36, 37]. Это указывает на то, что для обоих факторов элонгации, EF-Tu и SelB, более предпочтительным аналогом ГТФ является GTPγS.

В свете приведенных выше аргументов наиболее реалистичным представляется сценарий, при котором состояние активного комплекса соответствует структуре, в которой молекула воды находится между γ-фосфатом и протонированным остатком His84 [24]. Этот вариант предполагает, что воздействие молекулы воды на фосфат включает перенос протона от молекулы воды к одному из фосфатных кислородов, а не к остатку гистидина. Возможны два предельных случая реализации такого механизма, соответствующих ассоциативному и диссоциативному путям (рис. 2, *б* и *в*) [38, 39]. Ассоциативный путь включает перенос протона на немостиковый кислород фосфата с последующей атакой гидроксид-иона. Второй предельный случай, диссоциативный путь, соответствует отрыву метафосфата с последующей атакой незаряженной воды. В итоге перенос протона на уходящую группу ГДФ будет происходить либо через кислород фосфата, либо при участии дополнительных молекул воды.

Несмотря на десятилетия исследований детальный молекулярный механизм реакции гидролиза ГТФ до сих пор не до конца понятен и вызывает споры относительно пути протекания реакции и основы каталитической активности ГТФаз. В этом обзоре приводятся результаты анализа современной литературы по теме стимуляции ГТФазной активности трех факторов элонгации, EF-Tu, EF-G и SelB, а также механизма реакции гидролиза ГТФ. Примечательно, что существенно различающиеся аминокислотные последовательности этих белков складываются в схожие структуры G-домена для того, чтобы обеспечить взаимодействие функционально различных элонгационных факторов с одной и той же областью рибосомы и образовать практически одинаковые каталитические сайты, позволяя предположить наличие общего ме-

ханизма активации трГТФаз на рибосоме [2, 10]. Таким образом, данные, полученные для EF-Tu, EF-G и SelB, могут дополнять друг друга и способствовать составлению более целостной картины функционирования трГТФаз на рибосоме.

ФАКТОРЫ ЭЛОНГАЦИИ – G-БЕЛКИ

В процессе биосинтеза белка удлинение полипептидной цепи происходит за счет циклически повторяющихся этапов декодирования (доставки аминоацил-тРНК (аа-тРНК) в А сайт), образования пептидной связи и транслокации (перемещения рибосомы к следующему кодону мРНК). Высокая скорость и однонаправленность цикла элонгации реализуется благодаря функционированию трГТФаз факторов элонгации: EF-Tu, EF-G и SelB.

Элонгационный фактор EF-Tu является одной из наиболее изученных трГТФаз. Он состоит из трех доменов: домена I (G-домена), который связывает гуаниновый нуклеотид, и двух β-цилиндров – доменов II и III, которые вместе с доменом I обеспечивают поверхность связывания для акцепторной области аа-тРНК [40]. В своей активной ГТФ-связанной форме EF-Tu образует высокоаффинный комплекс с аа-тРНК и доставляет ее в А-сайт рибосомы [23, 41, 42]. Распознавание кодона мРНК антикодоном тРНК приводит к быстрому гидролизу ГТФ [43, 44]. При этом значительные конформационные изменения EF-Tu вызывают высвобождение акцепторного стебля аа-тРНК из EF-Tu и последующую диссоциацию EF-Tu–ГДФ из рибосомы [21, 45]. Рециркуляция неактивной (связанной с ГДФ) формы EF-Tu в EF-Tu–ГТФ катализируется фактором обмена нуклеотидов EF-Ts [46, 47].

Фактор элонгации EF-G состоит из 5 доменов [48]. Домен I (G-домен) связывает ГТФ/ГДФ и вместе с доменом II образует структурный супердомен, характерный для многих трГТФаз. Домены III–V специфичны для EF-G и необходимы для выполнения основной функции фактора – транслокации тРНК и экспонирования нового кодона мРНК в вакантном А сайте рибосомы. Помимо канонической функции по активации транслокации EF-G также участвует в рециркуляции рибосом – процессе, при котором рибосома после окончания синтеза полипептидной цепи диссоциирует на малую и большую рибосомные субъединицы для подготовки к трансляции следующей мРНК [49]. У большинства бактерий обе функции выполняются одним белком, однако в ряде случаев эти функции разделены между продуктами паралогичных генов [50]. В ГТФ-связанной форме EF-G взаимодействует с рибосомой, что приводит к быстрому протеканию реакции гидролиза ГТФ, транслокации и последующему высвобождению EF-G–ГДФ и неорганического фосфата (P_i) из рибосомы [51]. Учитывая схожую аффинность EF-G к ГТФ и ГДФ, кинетическую подвижность комплекса фактора с нуклеотидом и высокую внутриклеточную концентрацию ГТФ, фактор может спонтанно обменять ГДФ на ГТФ без помощи фактора обмена нуклеотидов [52].

Специализированный элонгационный фактор SelB в процессе рекодирования стоп-кодона UGA доставляет к рибосоме селеноцистеиниловую тРНК (SectРНК^{Sec}) для встраивания неканонической аминокислоты селеноцистеина (Sec). SelB состоит из 4 доменов [53]. I–III домены структурно схожи с доменами EF-Tu и выполняют аналогичные функции: домен I (G-домен) взаимодействует с гуаниновым нуклеотидом и в комбинации со II и III доменами образует область для связывания тРНК. IV домен уникален и не встречается в других трГТФазах, он обеспечивает взаимодействие фактора со специфической вторичной структурой мРНК, так называемым SECIS-элементом (Sec Inserting Sequence), который у бактерий располагается сразу после UGA кодона и определяет встраивание Sec [54]. В отсутствие шпилькообразной SECIS-структуры в мРНК кодон будет распознаваться как терминирующий. В своей активной SelB–ГТФ форме фактор связывает SectРНК^{Sec} с экстраординарно высокой аффинностью (0,2 пМ), что обеспечивает защиту лабильного остатка Sec от преждевременного гидролиза и окисления [55]. Нахождение тРНК-ассоциированного фактора в непосредственной близости от Sec-встраивающего кодона обеспечивается благодаря взаимодействию IV домена SelB со вторичной структурой мРНК. Гидролиз ГТФ фактором после распознавания кодона мРНК приводит к высвобождению и аккомодации тРНК на рибосоме, SelB–ГДФ теряет аффинность к рибосоме и шпильке мРНК и диссоциирует [20]. В свободном состоянии SelB легко обменивает ГДФ на ГТФ, так как обладает к последнему более высокой аффинностью [54, 55].

Несмотря на различные функции факторов элонгации, наличие общей области связывания с рибосомой, СРП рРНК, и схожее строение каталитического сайта позволяют предположить единый механизм активации гидролитической активности трГТФаз на рибосоме. При этом механизм реакции гидролиза ГТФ факторами в свободном состоянии вне рибосомы (спонтанный гидролиз) может отличаться от такового на рибосоме.

СПОНТАННЫЙ ГИДРОЛИЗ ГТФ ФАКТОРАМИ ЭЛОНГАЦИИ

Трансляционные ГТФазы обладают низкой спонтанной активностью гидролиза ГТФ, что, безусловно, оправдано с энергетической точки зрения. Изучение процесса гидролиза ГТФ факторами элонгации вне рибосомы, вероятно, не имеющего функционального значения в реальных условиях, может дать представление о механизме катализа и быть интересным с эволюционной точки зрения.

Во всех известных структурах свободных ГТФ-связанных факторов EF-Tu [56, 57], EF-G [58] и SelB [37, 59], а также в составе тройного комплекса, состоящего из EF-Tu, ГТФ и аа-тРНК [41], His84 ориентирован в направлении от γ-фосфата и не образует необходимых для активации реакции гидролиза взаимодействий (рис. 3, *а–в*). В структуре свободного фактора в активной конформации EF-Tu–ГТФ вращение боковой цепи His84 в направлении активного сайта затруднено остатками Val20 и Ile60, которые также называют «гидрофобными воротами» [6]. Функция данных остатков в случае свободного фактора в растворе – препятствие позиционированию молекулы воды между консервативным гистидином и ГТФ, а в случае фактора в комплексе с рибосомой – приближение избыточных молекул растворителя к реакционному центру. Таким образом, в несвязанном с рибосомой EF-Tu переориентация His84 в направлении γ-фосфата невозможна, и His84 не участвует в катализе (рис. 3, *а* и *г*). Данные анализа модифицированных вариантов фактора EF-Tu подтвердили данное предположение, продемонстрировав, что замена важного для активации реакции гидролиза ГТФ на рибосоме остатка His84 на ряд аминокислот не приводит к существенному изменению скорости спонтанного гидролиза EF-Tu–ГТФ вне рибосомы [12].

Достаточно распространенной является точка зрения о том, что сомкнутые «гидрофобные ворота» препятствуют активации гидролиза ГТФ не только в случае EF-Tu, но и в случае других элонгационных факторов, в частности EF-G [13]. Однако в большинстве имеющихся пространственных структур свободного фактора EF-G данные гидрофобные а.о. не разрешены [60, 61], а в единственной структуре с разрешенными «гидрофобными воротами» [58] данные остатки располагаются довольно далеко от остатка гистидина и не могут препятствовать активации гидролиза ГТФ фактором вне рибосомы (рис. 3, *б*). В случае SelB гомологичные остатки находятся приблизительно на одинаковом расстоянии друг от друга вне зависимости от того, находится ли SelB в свободном состоянии [59] или связан с рибосомой (рис. 3, *в* и *е*) [20]. Более того, анализ молекулярной динамики SelB–ГТФ–SectРНК^{Sec} в растворе предполагает, что инвариантный His61 способен быстро колебаться между неактивной (направленной в сторону от γ-фосфата) и активной (направленной к γ-фосфату) конформациями, а остатки Val9 и Met36, гомологичные остаткам «гидрофобных ворот» в EF-Tu и EF-G, могут свободно раздвигаться [20]. Эти данные указывают на то, что, в отличие от EF-Tu, в EF-G и SelB «гидрофобные ворота» не блокируют возможность взаимодействия предположительно каталитического остатка гистидина с γ-фосфатом ГТФ. Возможно, именно с этим связан тот факт, что при переходе от активированной рибосомой реакции к собственной гидролитической активности фактора скорость гидролиза EF-Tu–ГТФ снижается на семь порядков [12], тогда как для EF-G и SelB это значение достигает лишь четырех порядков [13, 20]. Таким образом, механизм реакции спонтанного гидролиза элонгационными факторами может различаться, несмотря на высокую степень консерватизма в структуре ГТФ-связывающего домена. His84, скорее всего, не участвует в катализе реакции гидролиза ГТФ свободным EF-Tu, однако может принимать участие в формировании каталитического центра в случае EF-G и SelB. Увеличение скорости реакции гидролиза EF-G–ГТФ и SelB при взаимодействии с рибосомой на четыре порядка может объясняться дополнительной стабилизацией активированного состояния, отсутствующей в случае свободных факторов. Для подтверждения этой теории необходимы дальнейшие структурные и биохимические исследования, поскольку на данный момент существуют некоторые расхождения в данных, не позволяющие однозначно установить возможность участия гистидина в реакции гидролиза ГТФ в свободном EF-G. Так, результаты исследования Cunha et al. [14] демонстрируют полное исчезновение гидролитической активности EF-G даже в присутствии рибосом в случае замены His на Ala, тогда как в исследовании, проведенном Koripella et al. [13], аналогичная замена приводит лишь к десятикратному снижению скорости реакции гидролиза ГТФ фактором EF-G на рибосомах и практически не имеет эффекта в случае свободного фактора. Экспериментальное подтверждение потенциальной роли консервативного остатка His в гидролизе ГТФ SelB пока отсутствует.

Возможность разных вариантов механизма гидролиза изолированными факторами можно объяснить различиями в каталитическом центре

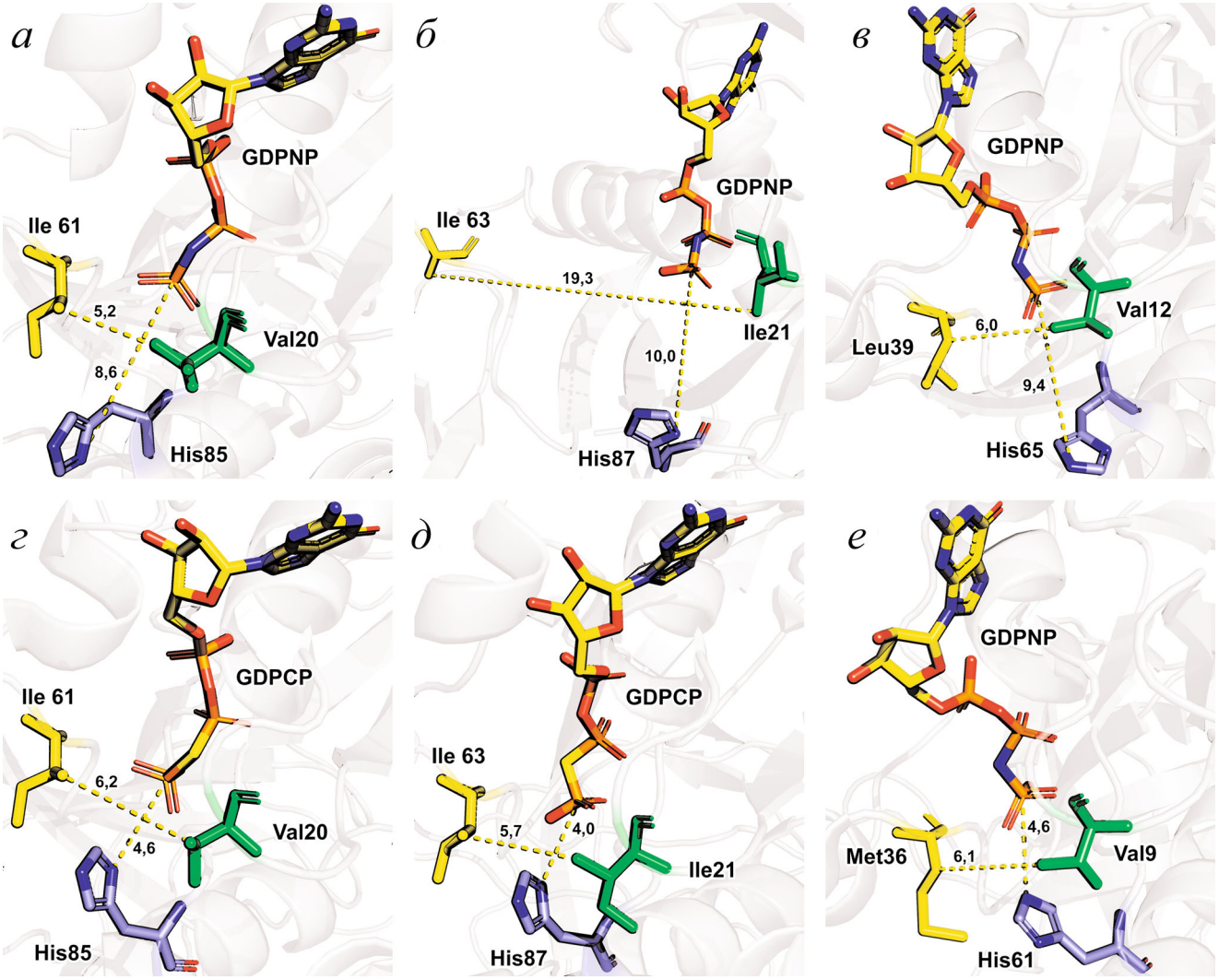


Рис. 3. Взаимное расположение остатка инвариантного His, аналога ГТФ и а.о. «гидрофобных ворот» EF-Tu (PDB ID код 1exm [57]) (*а*), EF-G (PDB ID код 2bv3 [58]) (*б*) и SelB (PDB ID код 4zu9 [59]) (*в*) в изолированном состоянии, EF-Tu (PDB ID код 4v5l [17]) (*г*), EF-G (PDB ID код 4v90 [18]) (*д*) и SelB (PDB ID код 5lzd [20]) (*е*) в связанном с рибосомой состоянии. Расстояния указаны в Å

EF-Tu и EF-G. Так, критически важный для реакции гидролиза на рибосоме остаток Asp21 P-петли находится в активированном положении в EF-Tu как на рибосоме, так и в свободном состоянии, тогда как в EF-G правильная ориентация данного остатка достигается только при взаимодействии фактора с рибосомами [19]. В отличие от His84, Asp21, вероятно, участвует в реакции гидролиза EF-Tu–ГТФ вне рибосомы, так как при замене остатка His скорость реакции спонтанного гидролиза EF-Tu практически не изменяется, тогда как замена Asp21 на ряд аминокислот приводит к снижению гидролитической активности фактора вне рибосомы [12]. Более того, было показано, что ион K^+ играет роль структурного кофактора и стимулирует собственную ГТФазную активность EF-Tu [62]. Активация достигается благодаря связыванию моновалентного катиона между консервативным остатком Asp и инвариантным остатком Gly в регионе switch II [63], тогда как замена Asp на Ala приводит к неспособности модифицированного варианта белка координировать ион K^+, что нивелирует стимулирующий эффект [12].

Таким образом, можно предположить, что механизмы спонтанной гидролитической активности могут различаться для разных факторов. И если для EF-G и SelB есть основания полагать, что важным является остаток His региона switch II, то для спонтанной гидролитической активности EF-Tu большее значение имеет остаток Asp21 P-петли. Однако нельзя исключать и вариант, при котором ни один из этих остатков не участвует в реакции гидролиза ГТФ изо-

лированными факторами элонгации, а процесс реализуется по некоторому иному, пока не идентифицированному механизму.

ВНЕШНЯЯ СТИМУЛЯЦИЯ ГТФазной АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ЭЛОНГАЦИИ

Достаточно низкая спонтанная гидролитическая активность трГТФаз значительно стимулируется при взаимодействии с СРП 23S рРНК большой рибосомной субъединицы [17, 31, 64], которая представляет собой одну из наиболее высоко консервативных последовательностей рРНК. Конец этой петли близко подходит к связанной молекуле ГТФ в соответствующих G-доменах трГТФаз [17, 64].

Помимо взаимодействия с СРП, трГТФазы могут иметь дополнительные элементы, стимулирующие ГТФазную активность, что является принципиальным для выполнения их функции. Так, поскольку основная функция EF-Tu – доставка аа-тРНК для удлинения полипептидной цепочки, важной дополнительной детерминантой является кодон-антикодоновое взаимодействие, обеспечивающее распознавание корректной аминокислоты. Поэтому взаимодействие EF-Tu с вакантными рибосомами приводит лишь к некоторому стимулирующему эффекту, тогда как максимальное значение активации гидролиза (ускорение реакции гидролиза на шесть порядков) достигается в том случае, когда, помимо взаимодействия с СРП, происходит распознавание кодона мРНК на малой рибосомной субчастице [12]. Логично, что в случае SelB, который должен доставить SectРНК^{Sec} на рибосому, когда в А-сайте располагается стоп-кодон, обозначающий место встраивания Sec, а не окончание синтеза белковой цепи, добавляется еще одна детерминанта-стимулятор ГТФазной активности фактора. Для активации гидролитической функции SelB, помимо СРП и кодон-антикодонового взаимодействия, необходимо взаимодействие VI домена SelB с SECIS-элементом мРНК, который располагается сразу после Sec-определяющего кодона. Отсутствие кодон-антикодонового взаимодействия или взаимодействия с SECIS-элементом мРНК приводит к снижению скорости реакции гидролиза на два порядка [20].

Механизм активации трГТФаз лучше всего изучен на примере элонгационного фактора EF-Tu [10]. В составе тройного комплекса аа-тРНК прочно связана с EF-Tu–ГТФ [65], взаимодействуя в том числе и с регуляторными регионами switch I и II G-домена элонгационного фактора своим акцепторным стеблем [41]. Доставка аа-тРНК к транслирующей рибосоме приводит к возникновению дополнительных контактов антикодона тРНК с кодоном мРНК, экспонированным в А-сайте рибосомы [17, 22, 44]. Именно корректное кодон-антикодоновое взаимодействие является триггером продуктивных конформационных перестроек в тРНК, рибосоме и EF-Tu, ведущих к активации ГТФазной функции. Закрепление антикодона тРНК в центре декодирования на 30S рибосомной субъединице приводит к деформации молекулы тРНК [66], в результате которой происходит приближение EF-Tu к СРП [21] и, вероятно, изменение конформации региона switch II с переориентацией незаменимого остатка His84 EF-Tu [43]. В таком активированном состоянии боковая цепь His84 направлена на γ-фосфат ГТФ через «гидрофобные ворота» и образует водородные связи с нуклеофильной молекулой воды и с фосфатным кислородом нуклеотида A2662 СРП (рис. 1, *а* и 3, *г*) [17, 22]. Дополнительную стабилизацию конформации переходного состояния фактора осуществляют нуклеотиды СРП 23S рРНК большой субъединицы рибосомы, обширные взаимодействия которых с switch-регионами домена G были визуализированы при помощи реконструкции методом криоэлектронной микроскопии структуры тройного комплекса на рибосоме в момент после реакции гидролиза ГТФ, но до конформационной перегруппировки в ГДФ-форму [32, 67]. Гидролиз ГТФ дестабилизирует switch-регион EF-Tu [45, 68], приводит к ослаблению взаимодействия фактора элонгации с аа-тРНК и СРП и, в конечном счете, к диссоциации EF-Tu–ГДФ.

Принципиальная значимость остатка гистидина в положении 84 EF-Tu для гидролиза ГТФ на рибосоме была неоспоримо доказана мутационным анализом [11, 12, 15, 16]. Замена His на Leu, Ala и Arg приводила к значительному снижению скорости реакции, приближающемуся по значению к скорости реакции гидролиза ГТФ фактором вне рибосомы. При этом замена His84 на Gln, обнаруживаемый в данном положении в Ras-подобных и гетеротримерных G-белках, приводила к менее выраженному снижению скорости реакции гидролиза ГТФ, позволяя предположить, что NH_2-группа Gln может в некоторой степени заменить NH-группу His в регионе switch II трГТФаз и стабилизировать переходное состояние гидролиза ГТФ, как и в других группах G-белков [69]. Следует отметить, что для реализации данного механизма в случае EF-Tu критически важным является раскрытие «гидрофобных ворот», а также взаимодействие His84 с A2662 СРП большой рибосомной субъединицы, тогда как в отсутствие рибосомы гид-

ролиз ГТФ, вероятно, протекает по другому механизму, который не вовлекает боковую цепь His84 региона switch II EF-Tu.

Несмотря на то, что благодаря структурным и биохимическим исследованиям были определены основные элементы каталитического центра реакции, возможные пути протекания реакции до сих пор являются дискуссионными.

РОЛЬ ОСТАТКА КОНСЕРВАТИВНОГО ГИСТИДИНА В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГТФ

Для определения роли остатка His в реакции гидролиза EF-Tu–ГТФ использовали метод компьютерного симулирования молекулярной динамики [25] на основе существующей кристаллической структуры комплекса рибосом с EF-Tu–GDPCP [17]. Сравнение энергий нескольких возможных процессов в ГТФазном центре рибосомы и в водном растворе показало, что механизм, при котором His84 действует как каталитическое основание (с нуклеофильной атакой и захватом протона His84) (рис. 2, *а*), крайне маловероятен из-за значительной дестабилизации (+17,5 ккал·моль$^{-1}$), возникающей в результате близкого расположения гидроксида к γ-фосфату. Анализ свободной энергии реакций образования промежуточного соединения в процессе гидролиза ГТФ выявил практически одинаковые значения стабилизации для предельных случаев диссоциативного (–3,4 ккал·моль$^{-1}$) и ассоциативного (–3,7 ккал·моль$^{-1}$) механизмов реакции гидролиза ГТФ. В первом случае образуются переходные комплексы с метафосфатом, находящимся между нейтральной молекулой воды и уходящим ГДФ (рис. 2, *в*). При этом отсутствует взаимодействие между боковой цепью His84 и метафосфатом, который в основном стабилизируется взаимодействием с Lys24, основными NH-группами Thr61 и Gly83, а также со связанным с субстратом ионом Mg^{2+}. Во втором случае перенос протона воды на γ-фосфат в присутствии положительно заряженного остатка His84 приводит к стабильному положению гидроксид-иона (рис. 2, *б*), которое хорошо согласуется с кристаллической структурой [17]. Гидроксид-ион располагается в структуре оксианионовой дыры, которая образуется пептидным остовом трех а.о. (Pro82-Gly83-His84) окончания консервативного мотива региона switch II DXXGH и боковой цепью активной протонированной формы His84 (рис. 4). В этом случае гидроксид-ион также последовательно сохраняет свою водородную связь с карбонильной группой Thr61. Несмотря на равную вероятность реализации обоих механизмов, с точки зрения молекулярной динамики, есть некоторые аспекты, которые позволяют представить ассоциативный путь более обоснованным. Структура оксианионовой дыры идеально приспособлена для размещения и стабилизации отрицательного заряда, тогда как в случае реализации диссоциативного механизма в ней будет располагаться нейтральная молекула воды. При этом прогнозируемая роль His84 при диссоциативном механизме будет менее значимой, чем в случае ассоциативного механизма, при реализации которого большой предполагаемый эффект наличия His84 в активном состоянии хорошо согласуется с принципиальной значимостью остатка His в положении 84, подтвержденной экспериментально [11, 12]. Оба вышеуказанных аспекта свидетельствуют в пользу именно ассоциативного механизма реакции гидролиза ГТФ, который, скорее всего, можно распространить и на случаи других трГТФаз [70–72].

Важно отметить, что структура оксианионовой дыры, образованная мотивом PGH вместе с NH-группой главной цепи Thr61 и боковой цепью His84, формирует полость, которая может стабилизировать не только гидроксид-ион, но и уходящую фосфатную группу [25]. Стабилизация неорганического фосфата в нуклеотидсвязывающем кармане может быть причиной его замедленного по сравнению со скоростью протекания реакции гидролиза ГТФ высвобождения [73].

Помимо координирования каталитической молекулы воды и формирования оксианионовой дыры, боковая цепь His также может участвовать в высвобождении P_i после реакции гидролиза ГТФ, что является необходимым условием для диссоциации трГТФаз с рибосомы [74].

Изучение структурных особенностей EF-G на рибосоме выявило радикальное изменение ориентации His91 при гидролизе ГТФ. В структурах, содержащих EF-G с негидролизуемым аналогом ГТФ (активированное состояние перед реакцией гидролиза), боковая цепь His91 указывает на γ-фосфат [18, 19], тогда как в структурах с EF-G–ГДФ и фусидовой кислотой она поворачивается на 140° в противоположном направлении и оказывается в междоменном пространстве EF-G [64, 75]. Если в соответствии с данными молекулярно-динамического моделирования P_i остается связанным с His91 после реакции гидролиза ГТФ, наиболее вероятно, что он, следуя за His91, оказывается в области, представляющей собой беспрепятственный выходной путь, и покидает рибосому [13]. В поддержку этой теории говорят эксперименты с модифицированными вариантами EF-G, в которых His91 был заменен на Ala, Glu, Gln и Arg [13]. В

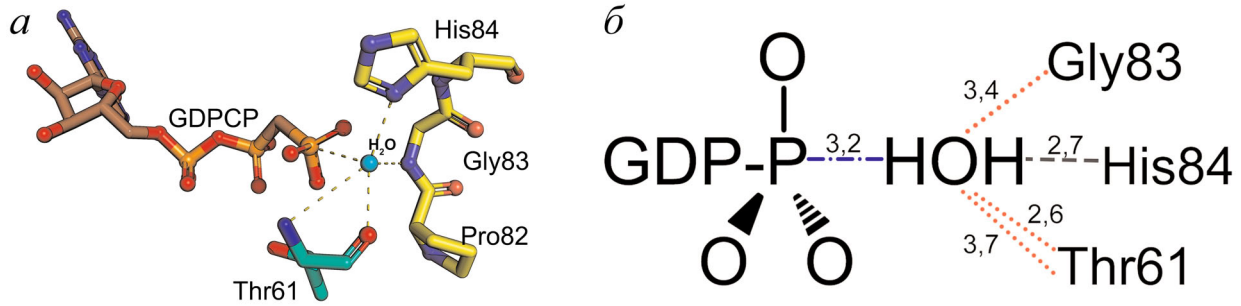


Рис. 4. Пространственная структура (*а*) и схематическое изображение (*б*) расположения молекулы воды в оксианионовой дыре, образованной пептидным остовом а.о. Pro82-Gly83-His84, боковой цепью протонированной формы His84 и NH-группой главной цепи Thr61 EF-Tu (PDB ID код 4v5l [17]). Взаимодействия боковой группы а.о. (– –), пептидного остова а.о. (· · ·), прочие взаимодействия (– · –). Расстояния указаны в Å. Нумерация *E. coli*

соответствии с эффектами, обнаруженными для EF-Tu, замена консервативного His приводила к разной степени нарушения гидролитической активности фактора в зависимости от а.о., оказывающегося в реакционном центре. При этом во всех случаях относительное снижение скорости высвобождения P_i превосходило нарушение реакции гидролиза. Таким образом, можно предположить, что тесная координация P_i с His91 и переориентация боковой цепи этого а.о. являются важными определяющими факторами для эффективного высвобождения P_i [13].

РОЛЬ ОСТАТКА КОНСЕРВАТИВНОЙ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГТФ

Еще одним консервативным среди трГТФаз остатком, способствующим ускорению реакции гидролиза ГТФ на рибосомах, является остаток аспарагиновой кислоты P-петли. Замена Asp21 на другие а.о. приводила к более выраженному снижению скорости реакции гидролиза ГТФ, стимулированной рибосомами, чем к изменению спонтанной гидролитической активности EF-Tu [12].

В EF-G Asp20 обеспечивает оптимальную ориентацию β- и γ-фосфатов. Asp20, аналогично His91, указывает в сторону от связанного нуклеотида в изолированном состоянии EF-G, но при взаимодействии с рибосомой переориентируется и приближается к ГТФ [19]. Asp20 контактирует с мостиковым кислородом, соединяющим β- и γ-фосфаты ГТФ, а также с кислородами этих фосфатных групп (рис. 1, *б*). Подобно His91, Asp20 приближает к γ-фосфату молекулу воды, которая может играть роль в катализе, образуя водородную связь с кислородом γ-фосфата. Активированная конформация Asp20 стабилизируется двумя ионами Mg^{2+}, которые координируются нуклеотидами GAGA области СРП (G2659–A2662) в полном соответствии с данными о том, что эти нуклеотиды являются важными детерминантами эффективного гидролитического функционирования EF-G [30, 76].

В отличие от EF-G, в EF-Tu и SelB, Asp P-петли находится в активированном, повернутом в сторону ГТФ состоянии постоянно, и для этого не требуется взаимодействие с рибосомой. Однако при связывании с СРП расстояние между Asp и гуаниновым нуклеотидом уменьшается и образуются связи, координирующие положение β- и γ-фосфатов ГТФ [20]. В рибосомном комплексе с SelB дополнительная стабилизация достигается за счет координации Asp фосфатной группой A2662 через ион Mg^{2+}, аналогично EF-G, тогда как в EF-Tu этот контакт не был обнаружен (рис. 1). Интересно, что различия между факторами элонгации проявляются также и в координации активного протонированного His84 нуклеотидами СРП. Для EF-Tu и EF-G это контакт фосфатного кислорода A2662 с NE2-группой His, тогда как в случае SelB – это взаимодействие 2′ OH-группы G2661 с ND1-группой His [17, 19, 20].

Значимость координации критически важных а.о. ГТФазного центра EF-G (His91 и Asp20) нуклеотидом A2662 была оценена путем замены фосфатных кислородов A2662 на метильные группы [76]. Было показано, что нарушение электростатического взаимодействия A2662 с His91 путем замены одного из двух неравнозначных кислородов на метильную группу приводит к полной потере способности фактора гидролизовать ГТФ. При этом замена второго кислорода фосфатной группы с нейтрализацией ее отрицательного заряда сохраняла реакционную способность фактора элонгации, приводя лишь к 8× снижению скорости реакции. С одной стороны, этот эффект можно объяснить общим снижением значения отрицательного заря-

да в основной цепи A2662, тогда как отрицательный заряд должен способствовать увеличению pK_a остатка His, обеспечить протонирование имидазольного кольца [25] и позволить образовать прочную водородную связь с молекулой каталитической воды. С другой стороны, замена кислорода на метильную группу приводит к неспособности A2662 координировать ион Mg^{2+}, который, в свою очередь, призван стабилизировать активную конформацию Asp20 [19]. Слабо выраженное снижение реакционной способности фактора может объясняться тем фактом, что достаточно большой радиус гидратированного иона Mg^{2+} может обеспечить его координацию другими нуклеотидами СРП, например G2655 или G2664. Более того, в стабилизации Asp20 EF-G участвует второй ион Mg^{2+}, координация которого нуклеотидом G2659 сохраняется [19].

Таким образом, несмотря на некоторые различия, возникающие на этапе активации ГТФазной активности факторов элонгации, достигается очень схожее активированное состояние, в котором процесс гидролиза ГТФ во многом определяется электростатическими взаимодействиями. Протонированный остаток His стимулирует перенос протона каталитической воды на γ-фосфатную группу ГТФ с последующей нуклеофильной атакой гидроксид-иона. При этом отрицательно заряженный γ-фосфат перемещается в результате однонаправленных воздействий остатков Asp21 и His84 и стабилизируется консервативным мотивом PGH. Рибосома не предоставляет каталитические остатки, но стимулирует реакцию гидролиза, стабилизируя продуктивную конформацию каталитического центра [77]. Таким образом, ускорение реакции гидролиза ГТФ на несколько порядков, осуществляемое рибосомой, достигается исключительно электростатическими эффектами стабилизации и экранирования [12, 78, 79], являясь удивительным примером чрезвычайно продуктивного использования ограниченной каталитической силы РНК [80].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01416).

Благодарности. Мы благодарим за плодотворные дискуссии всех сотрудников лаборатории биосинтеза белка ОМРБ НИЦ «КИ» – ПИЯФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmeing, T. M., and Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation, *Nature*, **461**, 1234-1242, Doi: 10.1038/nature08403.
2. Maracci, C., and Rodnina, M. V. (2016) Review: translational GTPases, *Biopolymers*, **105**, 463-475, doi: 10.1002/bip.22832.
3. Atkinson, C. G. (2015) The evolutionary and functional diversity of classical and lesser-known cytoplasmic and organellar translational GTPases across the tree of life, *BMC Genomics*, **16**, 78, doi: 10.1186/s12864-015-1289-7.
4. Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature*, **349**, 117-127, doi: 10.1038/349117a0.
5. Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1999) Structure of a ran-binding domain complexed with ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport, *Nature*, **398**, 39-46, doi: 10.1038/17969.
6. Hilgenfeld, R. (1995) Regulatory GTPases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 810-817, doi: 10.1016/0959-440X(95)80015-8.
7. Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic ras mutants, *Science*, **277**, 333-338, doi: 10.1126/science.277.5324.333.
8. Wittinghofer, A., Scheffzek, K., and Ahmadian, M. R. (1997) The Interaction of ras with GTPase-activating proteins, *FEBS Lett.*, **410**, 63-67, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00321-9.
9. Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science*, **294**, 1299-1304, doi: 10.1126/science.1062023.
10. Ævarsson, A. (1995) Structure-based sequence alignment of elongation factors Tu and G with related GTPases involved in translation, *J. Mol. Evol.*, **41**, 1096-104, doi: 10.1007/BF00173191.
11. Daviter, T., Wieden, H. J., and Rodnina, M. V. (2003) Essential role of histidine 84 in elongation factor Tu for the chemical step of GTP hydrolysis on the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **332**, 689-699, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00947-1.
12. Maracci, C., Peske, F., Dannies, E., Pohl, C., and Rodnina, M. V. (2014) Ribosome-induced tuning of GTP hydrolysis by a translational GTPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14418-14423, doi: 10.1073/pnas.1412676111.
13. Koripella, R. K., Holm, M., Dourado, D., Mandava, C. S., Flores, S., and Sanyal, S. (2015) A conserved histidine in switch-II of EF-G moderates release of inorganic phosphate, *Sci. Rep.*, **5**, doi: 10.1038/srep12970.
14. Cunha, C. E., Belardinelli, R., Peske, F., Holtkamp, W., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. (2013) Dual use of GTP hydrolysis by elongation factor G on the ribosome, *Translation*, **1**, e24315-11, doi: 10.4161/trla.24315.

15. Zeidler, W., Egle, C., Ribeiro, S., Wagner, A., Katunin, V., Kreutzer, R., Rodnina, M., Wintermeyer, W., and Sprinzl, M. (1995) Site-directed mutagenesis of *Thermus Thermophilus* elongation factor Tu: replacement of His85, Asp81 and Arg300, *Eur. J. Biochem.*, **229**, 596-604, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.0596j.x.
16. Scarano, G., Krab, I. M., Bocchini, V., and Parmeggiani, A. (1995) Relevance of histidine-84 in the elongation factor Tu GTPase activity and in poly(Phe) synthesis: its substitution by glutamine and alanine, *FEBS Lett.*, **365**, 214-218, doi: 10.1016/0014-5793(95)00469-P.
17. Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2010) The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome, *Science*, **330**, 835-838, doi: 10.1126/science.1194460.
18. Chen, Y., Feng, S., Kumar, V., Ero, R., and Gao, Y. G. (2013) Structure of EF-G-ribosome complex in a pre-translocation state, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1077-1084, doi: 10.1038/nsmb.2645.
19. Tourigny, D. S., Fernández, I. S., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2013) Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation, *Science*, **340**, 1235490–1235497, doi: 10.1126/science.1235490.
20. Fischer, N., Neumann, P., Bock, L. V., Maracci, C., Wang, Z., Paleskava, A., Konevega, A.L., Schröder, G. F., Grubmüller, H., Ficner, R., Rodnina, M. V., and Stark, H. (2016) The pathway to GTPase activation of elongation factor SelB on the ribosome, *Nature*, **540**, 80-85, doi: 10.1038/nature20560.
21. Loveland, A. B., Demo, G., and Korostelev, A. A. (2020) Cryo-EM of elongating ribosome with EF-Tu • GTP elucidates TRNA proofreading, *Nature*, **584**, 640-645, doi: 10.1038/s41586-020-2447-x.
22. Loveland, A. B., Demo, G., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2017) Ensemble Cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity, *Nature*, **546**, 113-117, doi: 10.1038/nature22397.
23. Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., and Stark, H. (2015) Structure of the *E. Coli* ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected Cryo-EM, *Nature*, **520**, 567-570, doi: 10.1038/nature14275.
24. Liljas, A., Ehrenberg, M., and Åqvist, J. (2011) Comment on "The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome", *Science*, **333**, 37, doi: 10.1126/science.1202472.
25. Wallin, G., Kamerlin, S. C. L., and Åqvist, J. (2013) Energetics of activation of GTP hydrolysis on the ribosome, *Nat. Commun.*, **4**, 1733, doi: 10.1038/ncomms2741.
26. Li, W., Liu, Z., Koripella, R. K., Langlois, R., Sanyal, S., and Frank, J. (2015) Activation of GTP hydrolysis in MRNA-TRNA translocation by elongation factor G, *Sci. Adv.*, **1**, e1500169-7, doi: 10.1126/sciadv.1500169.
27. Mercier, E., Girodat, D., and Wieden, H. J. (2015) A Conserved P-loop anchor limits the structural dynamics that mediate nucleotide dissociation in EF-Tu, *Sci. Rep.*, **5**, doi: 10.1038/srep07677.
28. Shi, X., Khade, P. K., Sanbonmatsu, K. Y., and Joseph, S. (2012) Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23s RRNA in the elongation cycle of protein synthesis, *J. Mol. Biol.*, **419**, 125-138, doi: 10.1016/j.jmb.2012.03.016.
29. Mitkevich, V. A., Shyp, V., Petrushanko, I. Y., Soosaar, A., Atkinson, G. C., Tenson, T., Makarov, A. A., and Hauryliuk, V. (2012) GTPases IF2 and EF-G bind GDP and the SRL RNA in a mutually exclusive manner, *Sci. Rep.*, **2**, 843, doi: 10.1038/srep00843.
30. Clementi, N., Chirkova, A., Puffer, B., Micura, R., and Polacek, N. (2010) Atomic mutagenesis reveals A2660 of 23S ribosomal RNA as key to EF-G GTPase activation, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 344-351, doi: 10.1038/nchembio.341.
31. Moazed, D., Robertson, J. M., and Noller, H. F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA, *Nature*, **334**, 362-364, doi: 10.1038/334362a0.
32. Stark, H., Rodnina, M. V., Wieden, H. J., Zemlin, F., Wintermeyer, W., and Van Heel, M. (2002) Ribosome interactions of aminoacyl-TRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 849-854, doi: 10.1038/nsb859.
33. Lin, J., Gagnon, M. G., Bulkley, D., and Steitz, T. A. (2015) Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during TRNA translocation, *Cell*, **160**, 219-227, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.049.
34. Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2011) Response to comment on "The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome", *Science*, **333**, 37, doi: 10.1126/science.1202532.
35. Kirby, A. J., and Jencks, W. P. (1965) The reactivity of nucleophilic reagents toward the P-nitrophenyl phosphate dianion, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3209-3216, doi: 10.1021/ja01092a036.
36. Paleskava, A., Konevega, A. L., and Rodnina, M. V. (2012) Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB, *J. Biol. Chem.*, **287**, 27906-27912, doi: 10.1074/jbc.M112.366120.
37. Leibundgut, M., Frick, C., Thanbichler, M., Böck, A., and Ban, N. (2005) Selenocysteine TRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimaera of elongation and initiation factors, *EMBO J.*, **24**, 11-22, doi: 10.1038/sj.emboj.7600505.
38. Klähn, M., Rosta, E., and Warshel, A. (2006) On the mechanism of hydrolysis of phosphate monoesters dianions in solutions and proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15310-15323, doi: 10.1021/ja065470t.
39. Åqvist, J., Kolmodin, K., Florian, J., and Warshel, A. (1999) Mechanistic alternatives in phosphate monoester hydrolysis: what conclusions can be drawn from available experimental data? *Chem. Biol.*, **6**, 71-80, doi: 10.1016/S1074-5521(99)89003-6.
40. Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O. A., Schirmer, N. K., Sprinzl, M., and Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements, *Nature*, **365**, 126-132, doi: 10.1038/365126a0.
41. Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F. C., and Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-TRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog, *Science*, **270**, 1464-1472, doi: 10.1126/science.270.5241.1464.
42. Fislage, M., Zhang, J., Brown, Z. P., Mandava, C. S., Sanyal, S., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2018) Cryo-EM shows stages of initial codon selection on the ribosome by Aa-TRNA in ternary complex with GTP and the GTPase-deficient EF-TuH84A, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 5861-5874, doi: 10.1093/nar/gky346.
43. Rodnina, M. V., Fricke, R., Kuhn, L., and Wintermeyer, W. (1995) Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome, *EMBO J.*, **14**, 2613-2619, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07259.x.
44. Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-TRNA to the A site of the *E. Coli* ribosome, *EMBO J.*, **17**, 7490-7497, doi: 10.1093/emboj/17.24.7490.

45. Yang, H., Perrier, J., and Whitford, P. C. (2018) Disorder guides domain rearrangement in elongation factor Tu, *Proteins*, 86, 1037-1046, doi: 10.1002/prot.25575.
46. Abel, K., Yoder, M. D., Hilgenfeld, R., and Jurnak, F. (1996) An α to β conformational switch in EF-Tu, *Structure*, **4**, 1153-1159, doi: 10.1016/S0969-2126(96)00123-2.
47. Gromadski, K. B., Wieden, H. J., and Rodnina, M. V. (2002) Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu, *Biochemistry*, **41**, 162-169, doi: 10.1021/bi015712w.
48. AEvarsson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., Al-Karadaghi, S., Svensson, L. A., and Liljas, A. (1994) Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus Thermophilus*, *EMBO J.*, **13**, 3669-3677, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06676.x.
49. Janosi, L., Hara, H., Zhang, S., and Kaji, A. (1996) Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF) – an important but overlooked step of protein biosynthesis, *Adv. Biophys.*, **32**, 121-201, doi: 10.1016/0065-227X(96)84743-5.
50. Margus, T., Remm, M., and Tenson, T. (2011) A computational study of elongation factor G (EFG) duplicated genes: diverged nature underlying the innovation on the same structural template, *PLoS One*, **6**, e22789, doi: 10.1371/journal.pone.0022789.
51. Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., and Wintermeyer, W. (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives TRNA movement on the ribosome, *Nature*, **385**, 37-41, doi: 10.1038/385037a0.
52. Wilden, B., Savelsbergh, A., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2006) Role and timing of GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent TRNA translocation on the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13670-13675, doi: 10.1073/pnas.0606099103.
53. Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P., and Böck, A. (1996) Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB, *J. Mol. Biol.*, **262**, 413-420, doi: 10.1006/jmbi.1996.0525.
54. Thanbichler, M., Böck, A., and Goody, R. S. (2000) Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia Coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA, *J. Biol. Chem.*, **275**, 20458-20466, doi: 10.1074/jbc.M002496200.
55. Paleskava, A., Konevega, A. L., and Rodnina, M. V. (2010) Thermodynamic and kinetic framework of selenocysteyl-TRNASec recognition by elongation factor SelB, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3014-3020, doi: 10.1074/jbc.M109.081380.
56. Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S., and Nyborg, J. (1993) The Crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus Aquaticus* in the GTP conformation, *Structure*, **1**, 35-50, doi: 10.1016/0969-2126(93)90007-4.
57. Hilgenfeld, R. (2000) Insights into the GTPase mechanism of EF-Tu from structural studies, in: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*, (Garrett, R., ed.), Washington, DC, pp. 347-357.
58. Hansson, S., Singh, R., Gudkov, A. T., Liljas, A., and Logan, D. T. (2005) Crystal structure of a mutant elongation factor G trapped with a GTP analogue, *FEBS Lett.*, **579**, 4492-4497, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.016.
59. Itoh, Y., Sekine, S. I., and Yokoyama, S. (2015) Crystal structure of the full-length bacterial selenocysteine-specific elongation factor SelB, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9028-9038, doi: 10.1093/nar/gkv833.
60. Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution, *EMBO J.*, **13**, 3661-3668, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06675.x.
61. Hansson, S., Singh, R., Gudkov, A. T., Liljas, A., and Logan, D. T. (2005) Structural insights into fusidic acid resistance and sensitivity in EF-G, *J. Mol. Biol.*, **348**, 939-949, doi: 10.1016/j.jmb.2005.02.066.
62. Fasano, O., De Vendittis, E., and Parmeggiani, A. (1982) Hydrolysis of GTP by elongation factor Tu can be induced by monovalent cations in the absence of other effectors, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3145-3150.
63. Kuhle, B., and Ficner, R. (2014) A monovalent cation acts as structural and catalytic cofactor in translational GTP ases, *EMBO J.*, **33**, 2547-2563, doi: 10.15252/embj.201488517.
64. Gao, Y. G., Selmer, M., Dunham, C. M., Weixlbaumer, A., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state, *Science*, **326**, 694-699, doi: 10.1126/science.1179709.
65. LaRiviere, F. J., Wolfson, A. D., and Uhlenbeck, O. C. (2001) Uniform binding of aminoacyl-TRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation, *Science*, **294**, 165-168, doi: 10.1126/science.1064242.
66. Mittelstaet, J., Konevega, A. L., and Rodnina, M. V. (2011) Distortion of TRNA upon near-cognate codon recognition on the ribosome, *J. Biol. Chem.*, **286**, 8158-8164, doi: 10.1074/jbc.M110.210021.
67. Valle, M., Sengupta, J., Swami, N. K., Grassucci, R. A., Burkhardt, N., Nierhaus, K. H., Agrawal, R. K., and Frank, J. (2002) Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-TRNA in the accommodation process, *EMBO J.*, **21**, 3557-3567, doi: 10.1093/emboj/cdf326.
68. Schmeing, M. T., Voorhees, R. M., Kelley, A. C., Gao, Y. G., Murphy IV, F. V., Weir, J.R., and Ramakrishnan, V. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-TRNA, *Science*, **326**, 688-694, doi: 10.1126/science.1179700.
69. Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer, *Q. Rev. Biophys.*, **32**, 1-56, doi: 10.1017/S0033583599003480.
70. Kötting, C., Blessenohl, M., Suveyzdis, Y., Goody, R. S., Wittinghofer, A., and Gerwert, K. (2006) A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13911-13916, doi: 10.1073/pnas.0604128103.
71. Pasqualato, S., and Cherfils, J. (2005) Crystallographic evidence for substrate-assisted GTP hydrolysis by a small GTP binding protein, *Structure*, **13**, 533-540, doi: 10.1016/j.str.2005.01.014.
72. Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H. R., and Wittinghofer, A. (1995) Substrate-assisted catalysis as a mechanism for Gtp hydrolysis of P21ras and other GTP-binding proteins, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 36-44, doi: 10.1038/nsb0195-36.
73. Kothe, U., and Rodnina, M. V. (2006) Delayed release of inorganic phosphate from elongation factor Tu following GTP hydrolysis on the ribosome, *Biochemistry*, **45**, 12767-12774, doi: 10.1021/bi061192z.
74. Savelsbergh, A., Mohr, D., Kothe, U., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. (2005) Control of phosphate release from elongation factor G by ribosomal protein L7/12, *EMBO J.*, **24**, 4316-4323, doi: 10.1038/sj.emboj.7600884.
75. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P., and Noller, H. F. (2013) Crystal structures of EF-G – ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation, *Science*, **340**, 1236086, doi: 10.1126/science.1236086.
76. Koch, M., Flür, S., Kreutz, C., Ennifar, E., Micura, R., and Polacek, N. (2015) Role of a ribosomal RNA phosphate oxygen during the EF-G-triggered GTP hydrolysis,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112**, E2561-E2568, doi: 10.1073/pnas.1505231112.
77. Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1994) GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin α-GGDP-AIF-4, *Nature*, **372**, 276-279, doi: 10.1038/372276a0.
78. Adamczyk, A. J., and Warshel, A. (2011) Converting structural information into an allosteric-energy-based picture for elongation factor Tu activation by the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9827-9832, doi: 10.1073/pnas.1105714108.
79. Prasad, B. R., Plotnikov, N. V., Lameira, J., and Warshel, A. (2013) Quantitative exploration of the molecular origin of the activation of GTPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20509-20514, doi: 10.1073/pnas.1319854110.
80. Doudna, J. A., and Lorsch, J. R. (2005) Ribozyme catalysis: not different, just worse, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 395-402, doi: 10.1038/nsmb932.

PECULIARITIES IN ACTIVATION OF HYDROLYTIC ACTIVITY OF ELONGATION FACTORS

Review

E. V. Paleskava, M. Y. Kaiumov, S. V. Kirillov, and A. L. Konevega*

Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute", 188300 Gatchina, Leningrad Region, Russia; E-mail: konevega_al@pnpi.nrcki.ru

Received July 5, 2020
Revised August 1, 2020
Accepted August 1, 2020

Translational GTPases (trGTPases) belong to the family of G proteins and play key roles at all stages of protein biosynthesis on the ribosome. Unidirectional and cyclic functioning of G proteins is ensured by their ability to switch between the active and inactive states due to GTP hydrolysis accelerated by the auxiliary GTPase-activating proteins. Although trGTPases interact with the ribosomes in different conformational states, they bind to the same conserved region, which, unlike in classical GTPase-activating proteins, is represented by ribosomal RNA. The resulting catalytic sites have almost identical structure in all elongation factors suggesting a common mechanism of GTP hydrolysis. However, fine details of the activated state formation and significantly different rates of GTP hydrolysis indicate the existence of distinctive features upon GTP hydrolysis catalyzed by the different factors. Here, we present a contemporary view on the mechanism of GTPase activation and GTP hydrolysis by the elongation factors EF-Tu, EF-G, and SelB based on the analysis of structural, biochemical, and bioinformatics data.

Keywords: elongation factor, GTP hydrolysis, EF-Tu, EF-G, SelB, translation, ribosome

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1690 – 1700

УДК 577.322.9

ГИБЕРНАЦИЯ – СТАДИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИБОСОМ

Обзор

© 2020 К.С. Усачев[1], М.М. Юсупов[1,2]*, Ш.З. Валидов[1]

[1] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия; электронная почта: marat@igbmc.fr*

[2] *Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), 67400 Илькирш-Граффенштаден, Франция*

Поступила в редакцию 30.07.2020
После доработки 28.08.2020
Принята к публикации 28.08.2020

Эубактерии в ответ на стрессовые условия снижают уровень синтеза белка: разбирают рибосомы на 30S и 50S субъединицы или превращают их в трансляционно неактивные 70S и 100S комплексы. При этом решаются две принципиально важные для клетки задачи: 1) снижение расходов на биосинтез белка в неблагоприятных условиях и 2) консервация функциональных рибосом для быстрого возобновления синтеза белка при восстановлении внешних благоприятных условий. Все известные гены белков сайленсинга или гибернации рибосом располагаются в оперонах, связанных с ответом на голодание, как одним из стрессов, что очевидно помогает координировать замедление синтеза белка и общий ответ на стрессы. Вероятно, системы гибернации могут работать как регуляторы, которые позволяют привести скорость синтеза белка в соответствие с энергетическим состоянием клетки. Учитывая лимитированное количество питательных веществ в естественных условиях и постоянное действие других стрессов на бактериальную клетку, бактериальная рибосома должна проводить большую часть времени в комплексе с белками сайленсинга/гибернации. Таким образом, между стадией рециркуляции и стадией инициации трансляции существует дополнительная стадия, в которой рибосома поддерживается в «консервированном» состоянии в виде субъединиц, нетранслирующих 70S частиц или 100S димеров. Механизм гибернации рибосом консервативен, прошел долгий эволюционный путь и необходим для поддержания энергозатратного и ресурсоемкого процесса биосинтеза белка в организмах, обреченных на жизнь в меняющихся условиях окружающей среды в условиях стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, трансляция, гибернация, сайленсинг.

DOI: 10.31857/S0320972520110111

СТРЕСС ЯВЛЯЕТСЯ ПОСТОЯННЫМ СПУТНИКОМ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Неблагоприятные или стрессовые условия, такие как экстремальные значения температуры и pH, дефицит влаги, гипооксигенация и голодание приводят к замедлению роста микроорганизмов, поскольку в этих условиях ограничено количество питательных веществ и/или количество доступных доноров и акцепторов электронов, что затрудняет извлечение энергии из субстратов [1]. Вероятно, в природе микроорганизмы постоянно находятся под воздействием тех или иных стрессовых условий, что препятствует их интенсивному размножению, например такому, которое наблюдается в лабораторных средах, где условия близки к идеальным. Однако даже в этих почти идеальных условиях классическое представление о росте культуры микроорганизмов выделяет 6 фаз: логарифмическая фаза, фаза ускорения роста, экспоненциальная фаза, фаза замедления роста, стационарная фаза и фаза отмирания клеток [2]. Стационарная фаза характеризуется остановкой роста культуры и, как и в случае фазы замедления роста, связана, прежде всего, с истощением питательных веществ в среде, то есть с голоданием клеток. В природе большинство микроорганизмов находятся в стадии остановленного роста, что близко к состоянию клеток в фазе замедле-

Принятые сокращения: EF-G – фактор элонгации; HPF – фактор гибернации рибосом, hibernation promoting factor; RaiA – ассоциированный с рибосомами ингибитор A, ribosome associated inhibitor A; RbfA – связывающий рибосому фактор A, ribosome binding factor A; RBS – сайт связывания рибосомы, ribosome binding site; RimM – фактор созревания рибосомы M, ribosome maturation factor M; RimP – фактор созревания рибосомы P, ribosome maturation factor P; RMF – фактор, модулирующий рибосому, ribosome modulating factor; RRF – фактор рециркуляции рибосомы; RsfS – рибосомный сайленсинг-фактор.

* Адресат для корреспонденции.

ния роста и в стационарной фазе и нуждается в значительном энерго- и ресурсосбережении, которое реализуется как общее замедление метаболизма живой клетки [1]. При этом снижается интенсивность всех основных ресурсозатратных и энергоемких процессов – репликация ДНК с остановкой деления клеток [3], снижается уровень транскрипции и изменяется спектр транскрибируемых генов [4], кроме того, значительно снижается интенсивность трансляции и далее поддерживается на низком уровне синтез белка [5]. Хотя данное замедление метаболизма временное и предполагает в будущем возобновление активности клетки при наступлении благоприятных условий, отдельные работы указывают на возможные длительные сроки нахождения в стадии остановленного роста без гибели клеток [6].

Наряду со стрессовыми условиями, которые созданы окружающей средой, существует такое физиологическое состояние бактериальных культур, как биопленка, где снижение интенсивности биологических процессов необходимо для поддержания жизнеспособных клеток при гипооксигенации и меньшей доступности питательных веществ внутри матрикса биопленок [7]. Клетки со сниженной интенсивностью метаболизма, или покоящиеся клетки, часто обнаруживают у патогенных микроорганизмов, находящихся внутри организма хозяина [8]. Вероятно, снижение интенсивности метаболизма необходимо на отдельных стадиях паразитирования, поскольку покоящиеся клетки могут быть незаметны для иммунной системы организма хозяина и даже могут переживать повышение температуры или воздействие антибиотиков, как это показано для золотистого стафилококка, *Staphylococcus aureus* [9]. Необходимость систем голодания показана также для паразитирования в тканях растений: мутанты *Erwinia amylovora* по генам *rpoN* (сигма фактор голодания σ^{54}) и *yhbH* (*hpf*, фактор гибернации рибосом) были неспособны к размножению внутри плодов груши [10]. Таким образом, замедление метаболизма используется клетками бактерий для выживания в окружающей среде и для эффективного паразитирования и заключается в значительном угнетении репликации ДНК, изменениях на уровне транскрипции и снижении трансляционной активности, обеспечивая только небольшой уровень синтеза белка в покоящейся клетке.

СТАДИИ РАБОТЫ РИБОСОМЫ И СИНТЕЗ БЕЛКА

Трансляция – важнейший процесс, являющийся основой жизнедеятельности клетки, во время которого осуществляется биосинтез белка рибосомой, согласно прочтению генетического кода матричной РНК (мРНК) [11]. Рибосома является крупнейшим рибонуклеопротеиновым комплексом в клетке, который составляет 70S у прокариот [12] и 80S у эукариот [13] и состоит из двух субъединиц: большой (50S – у прокариот и 60S – у эукариот) и малой (30S – у прокариот и 40S – у эукариот). Малая субъединица отвечает за правильное прочтение кода мРНК и кодон/антикодоновое взаимодействие с тРНК. Функция большой субъединицы заключается в проведении пептидилтрасферазной реакции (образование пептидной связи в растущей цепи белка). Основными этапами трансляции являются: инициация [14], элонгация [15], терминация [16] и рециркуляция [17] (рис. 1). На стадии инициации происходит ассоциация субъединиц рибосомы на мРНК с позиционированием на старт-кодоне формил-метионил-тРНК в Р-сайте рибосомы. Этому процессу способствуют факторы инициации IF1, IF2 и IF3 [18]. На этапе элонгации с помощью фактора элонгации EF-G и EF-Tu [19] происходит удлинение полипептидной цепи путем связывания амино-ацилированной тРНК (аа-тРНК) в А-сайте рибосомы, согласно коду мРНК [11]. На стадии элонгации функционирует еще один фактор – EF-P, отвечающий за облегчение синтеза полипролиновых мотивов [20]. Делеция гена *efp* не является летальной для большинства эубактерий, однако эукариотический аналог этого белка – eIF5α, абсолютно необходим для жизнеспособности эукариотической клетки [21]. Когда трансляционный комплекс доходит до стоп-кодона мРНК, наступает этап терминации трансляции, в результате которого с помощью релиз-факторов первого (RF1, RF2) и второго (RF3) классов происходит высвобождение полипептида [16]. Следующая за этим рециркуляция заключается в диссоциации пост-терминационного комплекса (70S, мРНК, тРНК) на субъединицы при совместном воздействии фактора рециркуляции рибосомы (RRF) и EF-G [22]. Считается, что фактор инициации IF3, который связывается с 30S субъединицей, препятствует ассоциации субъединиц рибосомы до следующего этапа инициации [23]. Очевидно, часть 30S и 50S субъединиц могут реассоциировать и образовать вакантную 70S рибосому, которая, впрочем, может связываться с безлидерными РНК и осуществлять синтез белка, минуя стадию инициации [24]. Таким образом, в бактериальной клетке после диссоциации пост-терминационного комплекса рибосомы есть стадия, где присутствуют 30S и 50S субъединицы и может образо-

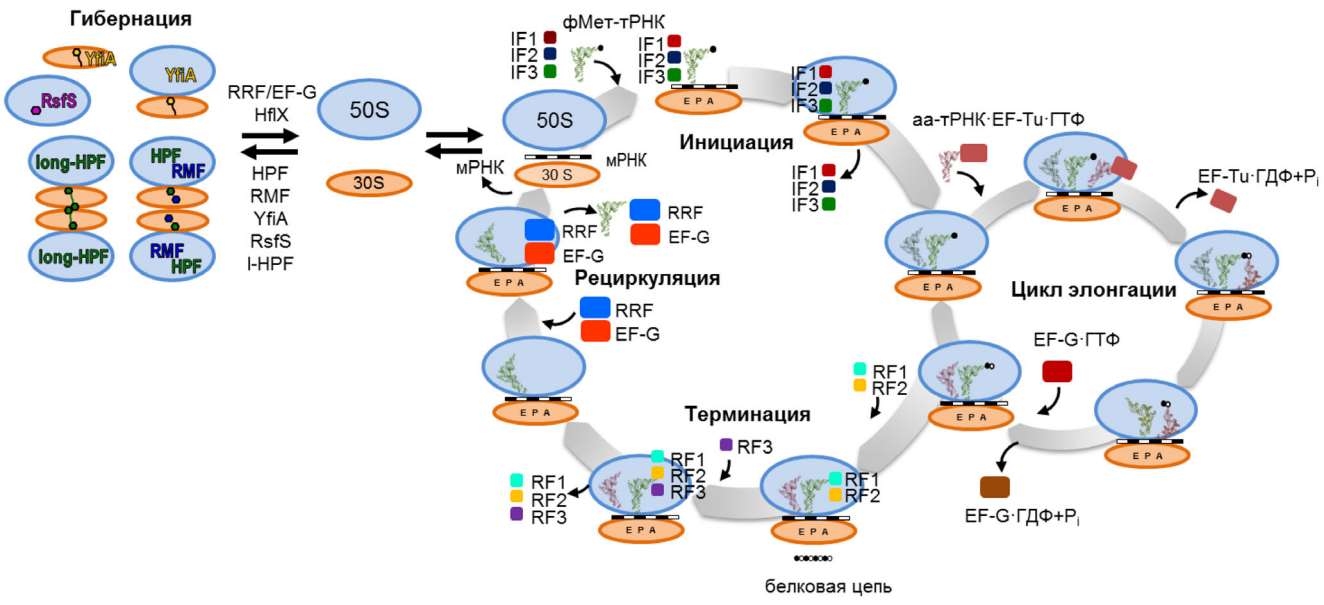


Рис. 1. Биосинтез белка бактерий. (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

ваться вакантная нетранслирующая 70S рибосома, способная взаимодействовать с факторами гибернации.

ФАКТОРЫ ГИБЕРНАЦИИ КАК ОТВЕТ НА СТРЕСС

Голодание клеток, снижение уровня энергетических молекул, которые могут быть вызваны внешними стрессами, требуют также замедления синтеза белка [1]. Снижение интенсивности синтеза белка производится специальными факторами, которые блокируют работу рибосомы, непосредственно связываясь с ней [25] (рис. 2). Внимание к системам гибернации было стимулировано фактом обнаружения димеров рибосом в 1960 году. На тот момент было высказано предположение, что димеры являются неактивными комплексами полностью собранных рибосом, которые могут быть использованы в трансляции, что подтверждало появление димеров рибосом в стационарной фазе и их быстрое исчезновение при возобновлении активного роста [26].

RMF (ribosome modulating factor) фактор, модулирующий рибосому. RMF был исторически первым белком, на который обратили внимание, поскольку он производил димеризацию рибосом в клетках *Escherichia coli*, а для регистрации димеров рибосом инструментарий существовал уже начиная с 1960 года [26]. RMF практически отсутствует в логарифмической и значительно накапливается в стационарной фазе роста [32], что и объясняет одновременное появление димеров рибосом.

RMF обнаружен только у представителей γ-протеобактерий, и, возможно, является частью уникальной системы гибернации рибосом, которая сохранила основные принципы действия гибернационных систем, но реализовала это в виде белка, который изменяет конформацию самой рибосомы и стимулирует ее димеризацию. Две молекулы RMF присоединяются к двум свободным 70S частицам, подготавливая их к димеризации, после чего происходит образование 90S димеров. Далее в данный комплекс встраиваются две молекулы фактора гибернации рибосом (HPF), завершая образование 100S рибосомного комплекса, состоящего из двух 70S рибосом (рис. 2, *а*).

На экспрессию гена *rmf* оказывает влияние CRP (белок-рецептор цАМФ): в его отсутствие синтез RMF значительно снижен [33]. Очевидно, на экспрессию *rmf* также влияет другой алармон – (p)ppGpp [34, 35].

Структурные исследования в гетерологичной системе показали, что RMF (*E. coli*) является небольшим белком размером 55 а.о. (рис. 3), и при реконструкции димеров рибосом *in vitro* он связывается с малой субъединицей 70S рибосомы *Thermus thermophilus* вблизи 3′-конца 16S рРНК в области анти-RBS (Ribosome Binding Site, сайт связывания рибосомы) и стерически препятствует взаимодействию с RBS мРНК [30]. Эти данные были уточнены анализом 100S димеров рибосом, выделенных из клеток *E. coli* в стационарной фазе. Сайт связывания RMF рас-

полагается в полости, образованной белками uS2, uS7, uS9 и bS21, при этом α1-спираль RMF располагается между спиралями h28 и h37/h40 16S рРНК. Взаимодействию с сахаро-фосфатным остовом 16S рРНК способствует наличие положительно заряженных а.о. (Arg3, Lys5, Arg8, Arg11 и Arg15). Также наблюдается взаимодействие *N*-концевой и *C*-концевой α-спиралей RMF с белком uS7 [27]. RMF облегчает стабилизацию компактной конформации bS1, совместное действие белков препятствует взаимодействию мРНК с анти-RBS, что предотвращает инициацию трансляции. Кроме того, в интерфейсе димеризации *C*-концевой домен uS2 закрывает тоннель входа мРНК, препятствуя ее связыванию [27]. Можно утверждать, что RMF не препятствует инициации непосредственно, поскольку нет сообщений о взаимодействии RMF с отдельными малыми 30S субъединицами рибосомы и их димеризации. Поддержание 70S рибосом в комплексе, возможно, и является препятствием для инициации. Закрытие тоннеля для мРНК может являться инструментом для предотвращения трансляции безлидерных мРНК, которые всё же могут происходить на вакантных 70S рибосомах [24].

HPF и YfiA. Три гибернационных белка – короткий и длинный HPF, а также YfiA – сходны по аминокислотным последовательностям и проявляют значительную структурную гомологию, что может объясняться общностью происхождения (рис. 3). Короткий HPF (95–100 а.о.) встречается у γ-протеобактерий и участвует в образовании 100S димеров вместе с RMF [36]. Длинный вариант HPF (l-HPF, 160–190 а.о.) намного более распространен и встречается у эволюционно далёких видов эубактерий [28, 37, 38] и даже сохранился у пластид в растениях [39]. *N*-концевой домен длинного HPF гомологичен таковому у короткого HPF γ-протеобактерий, а *C*-концевой домен ответственен за димеризацию [40]. *N*-концевой домен YfiA также гомологичен короткому HPF, однако YfiA содержит еще и неструктурированную часть, которая составляет 14–30 а.о. (рис. 3). У γ-протеобактерий присутствуют как короткий HPF, так и YfiA, оба этих белка участвуют в гибернации рибосомы.

Короткий HPF (YhbN). Структура короткого варианта белка HPF представлена двумя α-спиралями и β-листом, состоящим из четырех β-тяжей (рис 3). Встраивание HPF в 90S димер, который был образован присоединением RMF, приводит к образованию 100S димеров рибосом [41] (рис. 2, *а*). Короткая форма HPF не способна димеризовать рибосому, дополняющая функ-

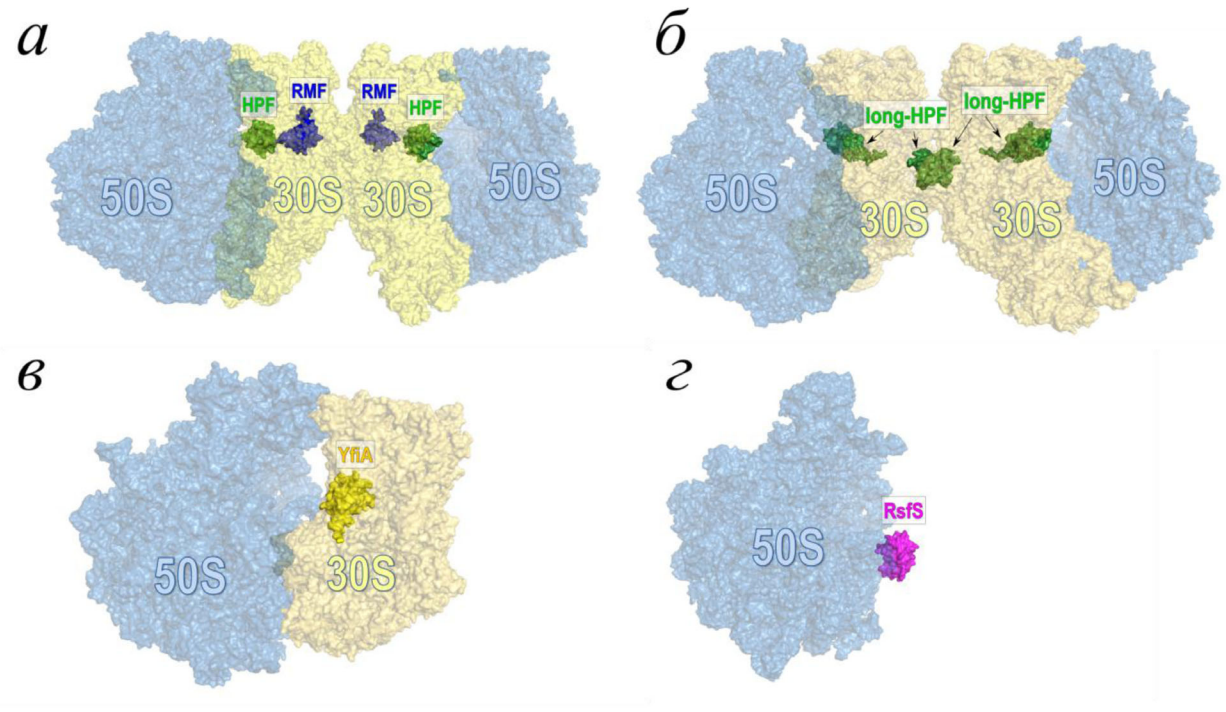
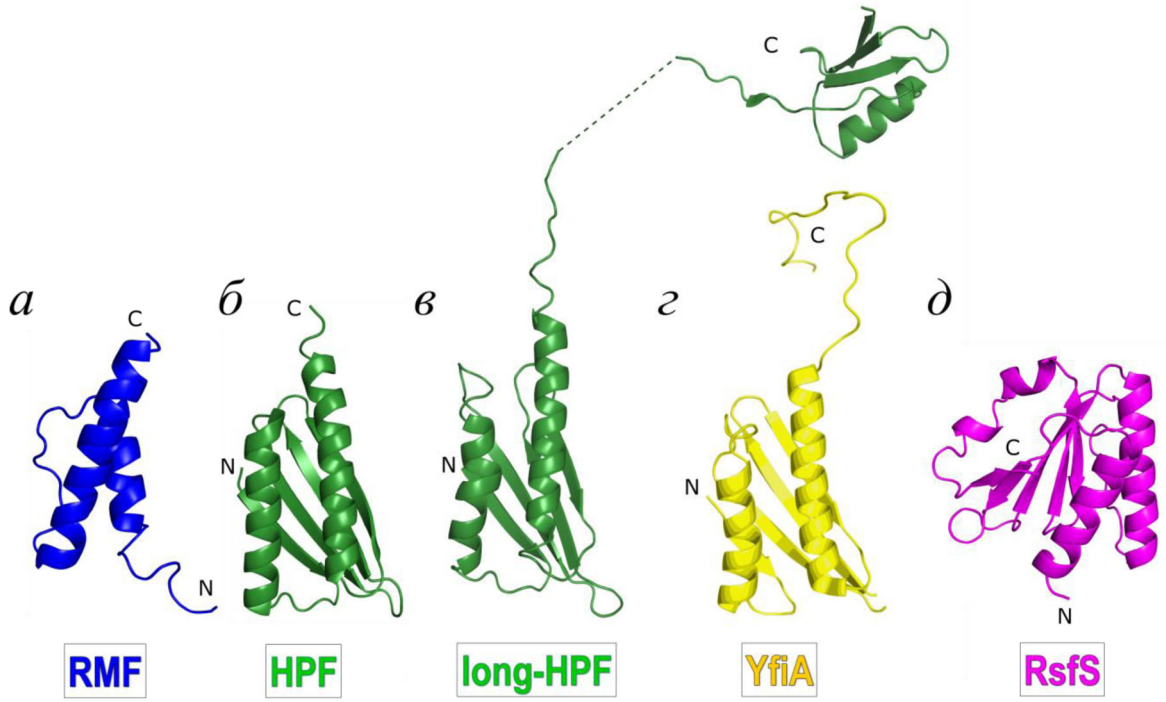


Рис. 2. Структуры комплексов рибосом с факторами гибернации/сайленсинга. *а* – 100S димер рибосом со связанными факторами RMF и коротким вариантом белка HPF (*Escherichia coli*) [27], *б* – 100S димер рибосом с длинным вариантом HPF (*S. aureus*) [28, 29], *в* – комплекс 70S рибосомы с фактором YfiA (*E. coli*) [30], *г* – комплекс 50S рибосомной субчастицы с фактором RsfS (*S. aureus*) [31]



е

```
l-HPF      MIRFEIHGDNLTITDAIRNYIEEKIGKLERYFNDVPNAVAHVKVKTYSNSATKIEVTIPL     60
HPF        -MQLNITGNNVEITEALREFVTAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKVT---HTSDATLHV     56
YfiA       -MTMNITSKQMEITPAIRQHVADRLAKLEKWQTHLINPHIILSKEPQG---FVADATINT     56
            : ::* ..:: ** *:*:.:  ::.***::   : :    :. :         :.*:

l-HPF      KNVTLRAEERNDDLYAGIDLINNKLERQVRKYKTRINRKSRDRGD-QEVFVAELQEMQET     119
HPF        NGGEIHASAEGQDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKQH---------------------     95
YfiA       PNGVLVASGKHEDMYTAINELINKLERQLNKLQHKGEARRAATSVKDANFVEEVEEE---     113
            .  : *. . :*:*:.*: : :** **: * : : : :

l-HPF      QVDNDAYDDNEIEIIRSKEFSLKPMDSEEAVLQMNLLGHDFFVFTDRETDGTSIVYRRKD     179
HPF        ------------------------------------------------------------     95
YfiA       ------------------------------------------------------------     113

l-HPF      GKYGLIQTSEQ    190
HPF        -----------    95
YfiA       -----------    113
```

Рис. 3. Структура факторов гибернации/сайленсинга: *а* – RMF (*E. coli*), *б* – HPF (*E. coli*), *в* – long-HPF (*S. aureus*), *г* – YfiA (*E. coli*), *д* – RsfS (*S. aureus*). *е* – Сравнение аминокислотных последовательностей белков l-HPF (*S. aureus*), HPF (*E. coli*) и YfiA (*E. coli*)

ция этого белка может быть объяснена его конкуренцией с белком YfiA за P- и A-сайты на малой субъединице рибосомы. *C*-концевой неструктурированный фрагмент YfiA, предположительно, препятствует взаимодействию рибосомы и RMF. Вероятно, этим фактом объясняется отсутствие димеров рибосом в мутантах *E. coli* Δ*hpf in vivo* [41]. HPF связывается в A и P сайтах 30S субъединиц близко к тРНК, располагающейся в E-сайте между спиралями 16S рРНК h30 и h44. Данные, полученные при изучении комплексов 100S димеров рибосом, выделенных из клеток *E. coli*, отличались от данных, полученных с помощью реконструкции димеров рибосом *in vitro* в гетерологичной системе. Интересным фактом является прямое взаимодействие HPF с деацилированной тРНК, находящейся в E-сайте, обнаруженное именно благодаря выделению димеров рибосом из клеток. При этом а.о. Arg33 и Lys93 белка HPF находятся на расстоянии, сопоставимом с длиной водородных связей, которые могут возникать с нук-

леотидами антикодоновой петли тРНК, находящейся в Е-сайте. Авторы предполагают, что наличие незагруженной тРНК в Е-сайте рибосомы (что происходит в случае голодания) может стимулировать образование димеров рибосом [27].

Длинный HPF (l-HPF). Длинный вариант HPF, в отличие от всех других родственных белков, состоит из двух структурированных доменов (рис. 3). *N*-концевой домен занимает А- и Р-сайты рибосомы, тогда как *C*-концевой домен отвечает за димеризацию (рис. 2, *б*). Два домена связаны между собой небольшим неструктурированным фрагментом размером 30–35 а.о. По своей структуре и функциям *N*-концевой домен является аналогом короткого HPF, за счет взаимодействия этого домена l-HPF удерживается в рибосоме, что было доказано в многочисленных экспериментах по реконструкции димеров рибосом в *S. aureus* [28, 29], *Bacillus subtilis* [42], *Lactococcus lactis* [43] и *T. thermophilus* [38]. Как было показано Khusainov et al. [28] *N*-концевой домен располагается в А- и Р-сайтах рибосомы, перекрывая места связывания гигромицина B, тетрациклина, эдеина, пактамицина и касугомицина и, возможно, защищает рибосому от взаимодействия с этими антибиотиками, что, вероятно, объясняет повышенную устойчивость покоящихся клеток эубактерий к ряду антибиотиков [9, 44]. Также было показано участие *C*-концевого домена белка l-HPF в димеризации [28, 29, 38, 42, 43] и выдвинуто предположение, что остаток фенилаланина в положении 160 играет ключевую роль в образовании димера белка HPF [42]. Более детальное исследование строения димера и вклада отдельных а.о. было проведено на изолированном *C*-концевом домене HPF *S. aureus*. Было показано, что для димеризации рибосом *in vitro* важны по крайней мере пять гидрофобных а.о.: Phe160, Val162, Ile173, Tyr175 и Leu185 [40].

Ассоциированный с рибосомой ингибитор YfiA (RaiA). Впервые нерибосомный белок (spot Y), расположенный в интерфейсе между субъединицами рибосомы, был обнаружен в 1986 году [45]. Первое сообщение о белке YfiA приводится в работе Link et al. [46], где он упомянут как белок, ассоциированный с рибосомой. Позднее этот же белок был локализован между субъединицами рибосомы и обозначен pY [47]. Добавление pY в бесклеточную систему ингибировало синтез белка, что и послужило причиной переименования данного белка в RaiA (ассоциированный с рибосомами ингибитор A, ribosome associated inhibitor A) [48]. Ввиду значительного сходства очень часто при аннотации геномов название RaiA также используется для короткого HPF и l-HPF, YfiA состоит из *N*-концевого домена, который, так же как и короткий HPF, и *N*-концевой домен l-HPF, занимает в рибосоме область А- и Р-сайтов, тогда как *C*-концевая неструктурированная часть, очевидно, располагается на поверхности 30S субъединицы, препятствуя взаимодействию рибосомы с RMF [30] (рис. 2, *в*, и рис. 3). В системе *E. coli* было показано, что YfiA может взаимодействовать как с 70S рибосомой, так и с малой (30S) субъединицей. Это взаимодействие препятствует инициации трансляции и способствует формированию гибернирующей 70S рибосомы [49].

Рибосомный сайленсинг-фактор RsfS (RsfA, YbeB). В отличие от белков HPF/RaiA и RMF рибосомный сайленсинг-фактор RsfS широко распространен у эубактерий [50] и даже обнаружен в геномах митохондрий [51]. RsfS является белком стационарной фазы и связывается с белком uL14 на большой (50S) субъединице рибосомы, препятствуя ассоциации субъединиц с формированием 70S инициаторного комплекса, что подавляет синтез белка в стрессовых условиях [52]. Делеционные мутанты *E. coli* по гену *rsfS* демонстрируют снижение адаптации при переходе с богатой среды на бедную и отличаются сниженной жизнеспособностью в стационарной фазе [50]. Детальную модель взаимодействия выявили последние исследования RsfS из *S. aureus* (рис. 2, *г*, и рис. 3). Поскольку структура uL14 в рибосоме при взаимодействии RsfS с 50S субъединицей, а также в изолированном гетеродимере uL14/RsfS не отличались, то данный гетеродимер был использован для изучения детального взаимодействия белков. В результате была определена структура с разрешением 2,3 Å, что позволило выявить взаимодействующие а.о. белков RsfS и uL14. На основе данных рентгеноструктурного анализа показано, что связывание двух белков опосредуется серией контактов как электростатических, так и гидрофобных. Примечательно, что взаимодействие между аминокислотами, такими как Arg97, Arg107, Lys113 из uL14 и Glu70, Asp81, Tyr98 из RsfS, сохраняется у RsfS из разных бактерий [31].

ЗНАЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ГИБЕРНАЦИИ ДЛЯ ВЫЖИВАНИЯ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ

Делеция генов гибернации рибосом не является летальной для бактериальной клетки и практически не влияет на параметры роста культуры в логарифмической фазе. Делеционные мутанты по генам сайленсинга/гибернации уступают дикому типу в жизнеспособности в стационарной фазе, а также при хранении или воздействии стресс-факторов [25]. Снижение

жизнеспособности и более длительная логарифмическая фаза у делеционных мутантов объясняются расходами энергии клетки на биосинтез белка, который не был снижен своевременно, как это происходит в норме при функционировании систем сайленсинга/гибернации.

Долгое время оставалась неясной роль димеризации рибосом, поскольку даже в отсутствие димеризующей активности l-HPF эффективно останавливает трансляцию. Недостающие данные были получены при исследовании мутантов *B. subtilis*, где было показано, что делеция гена *hpf* или нарушение механизма димеризации удлиненного варианта HPF приводит к потере белков uS2 и uS3 малой субъединицы рибосомы, которые располагаются в интерфейсе 100S димера [53]. Данные белки наиболее подвержены диссоциации, поскольку включаются в структуру рибосомы на конечной стадии созревания [54, 55], и их потеря приводит к деградации рРНК в рибосомах, не участвующих в трансляции.

Для компенсации данного процесса происходит экспрессия факторов созревания рибосомы RimM, RimP и RbfA, которые связываются с малой субъединицей в A- и P-сайтах и, так же как и HPF, играют роль шаперонов в сворачивании рРНК, участвуют в формировании и стабилизации центрального псевдоузла 16S рРНК [56–59]. Показано, что у 30S субъединиц рибосом, выделенных из штаммов *E. coli* с делецией генов *rimM* и *rbfA*, наблюдалась потеря белков uS2, uS3 и bS21, это означает, что процесс созревания *in vivo* остановился до того, как данные белки могут связаться с пре-30S субчастицей [58]. Таким образом, повреждение рибосом в делеционных мутантах может быть отчасти компенсировано белками биогенеза рибосомы RimM, RimP и RbfA.

Связывающий рибосому фактор A (RbfA, Ribosome binding factor A) – адаптивный белок холодового шока с молекулярной массой 14,9 кДа, обеспечивающий рост бактерий при низких температурах. Он является представителем большого семейства белков, обозначенного как RBFA, которые встречаются в протеомах большинства архебактерий и эубактерий [60, 61]. Ген *rbfA* необходим для нормального роста клеток при низких температурах (10–20 °C), и его делеция приводит к замедлению роста бактерий. Фактор созревания рибосомы M (RimM, ribosome maturation factor M) – консервативный у большинства эубактерий, отсутствующий у архей и обнаруженный только у четырех видов эукариот белок с молекулярной массой 21 кДа, участвующий в сборке 30S субъединицы рибосомы [62, 63]. Белок состоит из двух доменов с β-складчатой структурой, соединенных подвижной петлей. По своей структуре *N*-концевой домен схож с тРНК-связывающим доменом EF-Tu и содержит высоко консервативный мотив GXXG, характерный для белков с KH-доменом и зачастую участвующий во взаимодействии с РНК [64]. *C*-концевой домен RimM по своей структуре напоминает PRC-бочонок (Photosynthetic reaction center), однако в его составе отсутствует консервативный а.о., отвечающий за регуляцию окислительно-восстановительного процесса во время фотосинтеза [63, 65]. Функция *C*-концевого домена заключается в обеспечении взаимодействия 3′-домена 16S рРНК с рибосомными белками (в частности uS19) в процессе созревания 30S субъединицы [56, 62, 66]. Фактор созревания рибосомы P (RimP или YhbC, Ribosome maturation factor P) – высококонсервативный среди прокариот белок с молекулярной массой 41 кДа, участвующий в процессе сборки 30S субъединицы рибосомы и в формировании центрального псевдоузла 16S рРНК. Согласно данным количественного масс-спектрометрического анализа, в *E. coli* фактор RimP способствует связыванию рибосомных белков uS5, uS7 и uS12 с 5′-доменом рРНК *in vitro* [57]. Удаление гена *rimP* приводит к дестабилизации конформации центрального псевдоузла рРНК и накоплению интермедиатов рибосом, у которых отсутствовали белки uS5 и uS12 на стадии созревания [57]. Поскольку в клетках млекопитающих не обнаружен гомолог RimP, данный белок может выступать потенциальной мишенью для разработки антибактериальных препаратов. Интересно, что, согласно последним данным, мутации в гене *rimP* приводят к увеличению восприимчивости к даптомицину метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* [67].

ГИБЕРНАЦИЯ И САЙЛЕНСИНГ КАК ОТДЕЛЬНАЯ СТАДИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИБОСОМЫ

В условиях стресса клетка снижает уровень синтеза белка до наступления благоприятных условий. В это время избирательно транскрибируются опероны, связанные с голоданием и стресс-ответами вообще [1]. Таким образом, на невысоком уровне, но все же поддерживается синтез белков, в том числе факторов гибернации и сайленсинга, и их относительное количество ко всем остальным белкам может значительно повышаться, так как это показано в стационарной фазе для RMF [32], HPF [68], YfiA [49] и RsfS [50]. Мы предполагаем, что данные

белки связываются с субъединицами или образовавшимися вакантными 70S рибосомами, превращая их в инактивированные комплексы 50S–RsfS [31], 30S–YfiA [49], 70S–YfiA [49] и 100S–lHPF или 100S–RMF/HPF [69]. Далее данные комплексы с помощью совместного действия факторов RRF и EF-G или ГТФазы теплового шока HflX могут быть вновь разобраны до 30S и 50S субъединиц [70]. Однако в присутствии белков гибернации RMF, HPF, YfiA и RsfS субъединицы рибосомы, вероятно, вновь образуют неактивные комплексы (рис. 1). Учитывая постоянное состояние голодания и выживания клетки в условиях стрессов [6], стадия гибернации может быть протяженной во времени, возможно, даже превышающей все остальные стадии функционирования рибосом. При устранении давления стрессов профиль транскрипции изменяется, в силу чего количество белков гибернации по сравнению с факторами инициации и элонгации резко снижается, что, вероятно, позволяет рекрутировать большинство субъединиц в инициацию трансляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Системы гибернации широко представлены среди эубактерий и насчитывают по меньшей мере миллиард лет эволюции, поскольку встречаются также в органеллах эукариотической клетки, что говорит о появлении систем гибернации ещё до симбиотического образования митохондрий и пластид. Длительная инактивация рибосом и их хранение белками гибернации/сайленсинга, вероятно, является самостоятельной стадией функционирования рибосом, обеспечивающей экономию энергии и ресурсов клетки в условиях стрессов, а также сохраняющей синтезирующий белок аппарат для быстрого возобновления синтеза белка при улучшении внешних условий. Без возможности обратимой и контролируемой остановки белок-синтезирующего аппарата поддержание такого энерго- и ресурсоёмкого процесса, как биосинтез белка, было бы невозможно в меняющихся условиях окружающей среды.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-70021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergkessel, M., Basta, D. W., and Newman, D. K. (2016) The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology, *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 549-562, doi: 10.1038/nrmicro.2016.107.
2. Monod, J. (1947) Kinetics of bacterial growth, *Nature*, **160**, 105-106.
3. Kolter, R., Siegele, D. A., and Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle, *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 855-874, doi: 10.1146/annurev.mi.47.100193.004231.
4. Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 189-213, doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946.
5. Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., and Balaban, N. Q. (2014) Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 556-561, doi: 10.1073/pnas.1314114111.
6. Finkel, S. E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 113-120, doi: 10.1038/nrmicro1340.
7. Williamson, K. S., Richards, L. A., Perez-Osorio, A. C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P. S., and Franklin, M. J. (2012) Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population, *J. Bacteriol.*, **194**, 2062-2073, doi: 10.1128/JB.00022-12.
8. Tan, N. C., Cooksley, C. M., Roscioli, E., Drilling, A. J., Douglas, R., Wormald, P. J., and Vreugde, S. (2014) Small-colony variants and phenotype switching of intracellular *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis, *Allergy*, **69**, 1364-1371, doi: 10.1111/all.12457.
9. Tuchscherr, L., Medina, E., Hussain, M., Volker, W., Heitmann, V., et al. (2011) *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection, *EMBO Mol. Med.*, **3**, 129-141, doi: 10.1002/emmm.201000115.
10. Ancona, V., Li, W., and Zhao, Y. (2014) Alternative sigma factor RpoN and its modulation protein YhbH are indispensable for *Erwinia amylovora* virulence, *Mol. Plant. Pathol.*, **15**, 58-66, doi: 10.1111/mpp.12065.
11. Aitken, C. E., Petrov, A., and Puglisi, J. D. (2010) Single ribosome dynamics and the mechanism of translation, *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 491-513, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131427.
12. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution, *Science*, **292**, 883-896, doi: 10.1126/science.1060089.
13. Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011) The

structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution, *Science*, **334**, 1524-1529, doi: 10.1126/science.1212642.
14. Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 101-123, doi: 10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005.
15. Tollerson, R., 2nd, and Ibba, M. (2020) Translational regulation of environmental adaptation in bacteria, *J. Biol. Chem.*, **295**, 10434-10445, doi: 10.1074/jbc.REV120.012742.
16. Korostelev, A. A. (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome, *RNA*, **17**, 1409-1421, doi: 10.1261/rna.2733411.
17. Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. (2008) Structural insights into ribosome recycling factor interactions with the 70S ribosome, *J. Mol. Biol.*, **376**, 1334-1347, doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.048.
18. Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., Klaholz, B. P., and Yusupov, M. (2009) A structural view of translation initiation in bacteria, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 423-436.
19. Nilsson, J., and Nissen, P. (2005) Elongation factors on the ribosome, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **15**, 349-354, doi: 10.1016/j.sbi.2005.05.004.
20. Huter, P., Arenz, S., Bock, L. V., Graf, M., Frister, J. O., et al. (2017) Structural basis for polyproline-mediated ribosome stalling and rescue by the translation elongation factor EF-P, *Mol. Cell*, **68**, 515-527, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.014.
21. Golubev, A. A., Validov, S. Z., Usachev, K. S., and Yusupov, M. M. (2019) Elongation factor P: new mechanisms of function and an evolutionary diversity of translation regulation, *Mol. Biol.*, **53**, 501-512, doi: 10.1134/S0026893319040034.
22. Zhou, D., Tanzawa, T., Lin, J., and Gagnon, M. G. (2020) Structural basis for ribosome recycling by RRF and tRNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 25-32, doi: 10.1038/s41594-019-0350-7.
23. Seshadri, A., and Varshney, U. (2006) Mechanism of recycling of post-termination ribosomal complexes in eubacteria: a new role of initiation factor 3, *J. Biosciences*, **31**, 281-289, doi: 10.1007/Bf02703921.
24. Udagawa, T., Shimizu, Y., and Ueda, T. (2004) Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria, *J. Biol. Chem.*, **279**, 8539-8546, doi: 10.1074/jbc.M308784200.
25. Prossliner, T., Winther, K. S., Sorensen, M. A., and Gerdes, K. (2018) Ribosome hibernation, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 321-348, doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.
26. McCarthy, B. J. (1960) Variation in bacterial ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 563-564.
27. Beckert, B., Turk, M., Czech, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2018) Structure of a hibernating 100S ribosome reveals an inactive conformation of the ribosomal protein S1, *Nat. Microbiol.*, **3**, 1115-1121, doi: 10.1038/s41564-018-0237-0.
28. Khusainov, I., Vicens, Q., Ayupov, R., Usachev, K., Myasnikov, A., et al. (2017) Structures and dynamics of hibernating ribosomes from *Staphylococcus aureus* mediated by intermolecular interactions of HPF, *EMBO J.*, **36**, 2073-2087, doi: 10.15252/embj.201696105.
29. Matzov, D., Aibara, S., Basu, A., Zimmerman, E., Bashan, A., Yap, M. N. F., Amunts, A., and Yonath, A. E. (2017) The cryo-EM structure of hibernating 100S ribosome dimer from pathogenic *Staphylococcus aureus*, *Nat. Comm.*, **8**, 723, doi: 10.1038/s41467-017-00753-8.
30. Polikanov, Y. S., Blaha, G. M., and Steitz, T. A. (2012) How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis, *Science*, **336**, 915-918, doi: 10.1126/science.1218538.
31. Khusainov, I., Fatkhullin, B., Pellegrino, S., Bikmullin, A., Liu, W. T., et al. (2020) Mechanism of ribosome shutdown by RsfS in *Staphylococcus aureus* revealed by integrative structural biology approach, *Nat. Commun.*, **11**, 1656, doi: 10.1038/s41467-020-15517-0.
32. Yamagishi, M., Matsushima, H., Wada, A., Sakagami, M., Fujita, N., and Ishihama, A. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* rmf gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control, *EMBO J.*, **12**, 625-630.
33. Shimada, T., Yoshida, H., and Ishihama, A. (2013) Involvement of cyclic AMP receptor protein in regulation of the rmf gene encoding the ribosome modulation factor in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **195**, 2212-2219, doi: 10.1128/Jb.02279-12.
34. Izutsu, K., Wada, A., and Wada, C. (2001) Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp, *Genes Cells*, **6**, 665-676, doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00457.x.
35. Song, S., and Wood, T. K. (2020) ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **523**, 281-286, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.102.
36. Sato, A., Watanabe, T., Maki, Y., Ueta, M., Yoshida, H., Ito, Y., Wada, A., and Mishima, M. (2009) Solution structure of the *E. coli* ribosome hibernation promoting factor HPF: implications for the relationship between structure and function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 580-585, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.022.
37. Neira, J. L., Giudici, A. M., Hornos, F., Arbe, A., and Rizzuti, B. (2018) The C terminus of the ribosomal-associated protein LrtA is an intrinsically disordered oligomer, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19123902.
38. Flygaard, R. K., Boegholm, N., Yusupov, M., and Jenner, L. B. (2018) Cryo-EM structure of the hibernating *Thermus thermophilus* 100S ribosome reveals a protein-mediated dimerization mechanism, *Nat. Commun.*, **9**, 4179, doi: 10.1038/s41467-018-06724-x.
39. Boerema, A. P., Aibara, S., Paul, B., Tobiasson, V., Kimanius, D., et al. (2018) Structure of the chloroplast ribosome with chl-RRF and hibernation-promoting factor, *Nat. Plants*, **4**, 615-615, doi: 10.1038/s41477-018-0203-0.
40. Usachev, K. S., Fatkhullin, B. F., Klochkova, E. A., Miftakhov, A. K., Golubev, A. A., et al. (2020) Dimerization of long hibernation promoting factor from *Staphylococcus aureus*: structural analysis and biochemical characterization, *J. Struct. Biol.*, **209**, 107408, doi: 10.1016/j.jsb.2019.107408.
41. Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., and Wada, A. (2005) Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*, *Genes Cells*, **10**, 1103-1112, doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x.
42. Beckert, B., Abdelshahid, M., Schafer, H., Steinchen, W., Arenz, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., Bange, G., Turgay, K., and Wilson, D. N. (2017) Structure of the *Bacillus subtilis* hibernating 100S ribosome reveals the basis for 70S dimerization, *Embo J.*, **36**, 2061-2072, doi: 10.15252/embj.201696189.

43. Franken, L. E., Oostergetel, G. T., Pijning, T., Puri, P., Arkhipova, V., Boekema, E. J., Poolman, B., and Guskov, A. (2017) A general mechanism of ribosome dimerization revealed by single-particle cryo-electron microscopy, *Nat. Commun.*, **8**, 722, doi: 10.1038/s41467-017-00718-x.
44. McKay, S. L., and Portnoy, D. A. (2015) Ribosome hibernation facilitates tolerance of stationary-phase bacteria to aminoglycosides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 6992-6999, doi: 10.1128/AAC.01532-15.
45. Yusupov, M. M., and Spirin, A. S. (1986) Are there proteins between the ribosomal subunits? Hot tritium bombardment experiments, *FEBS Lett.*, **197**, 229-233, doi: 10.1016/0014-5793(86)80332-5.
46. Link, A. J., Robison, K., and Church, G. M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12, *Electrophoresis*, **18**, 1259-1313, doi: 10.1002/elps.1150180807.
47. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., Nazimov, I. V., and Spirin, A. S. (1999) A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12345-12349, doi: 10.1073/pnas.96.22.12345.
48. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (2001) Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage, *EMBO Rep.*, **2**, 399-402, doi: 10.1093/embo-reports/kve091.
49. Di Pietro, F., Brandi, A., Dzeladini, N., Fabbretti, A., Carzaniga, T., Piersimoni, L., Pon, C. L., and Giuliodori, A. M. (2013) Role of the ribosome-associated protein PY in the cold-shock response of *Escherichia coli*, *MicrobiologyOpen*, **2**, 293-307, doi: 10.1002/mbo3.68.
50. Hauser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., et al. (2012) RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors, *PLoS Genet.*, **8**, e1002815, doi: 10.1371/journal.pgen.1002815.
51. Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., Pajak, A., van den Brand, M. A. M., Gloerich, J., et al. (2012) C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4040-4051, doi: 10.1093/nar/gkr1271.
52. Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., and Maddock, J. R. (2007) Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques, *J. Bacteriol.*, **189**, 3434-3444, doi: 10.1128/Jb.00090-07.
53. Feaga, H. A., Kopylov, M., Kim, J. K., Jovanovic, M., and Dworkin, J. (2020) Ribosome dimerization protects the small subunit, *J. Bacteriol.*, **202**, e00009-20, doi: 10.1128/JB.00009-20.
54. Traub, P., and Nomura, M. (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 777-784, doi: 10.1073/pnas.59.3.777.
55. Mulder, A. M., Yoshioka, C., Beck, A. H., Bunner, A. E., Milligan, R. A., Potter, C. S., Carragher, B., and Williamson, J. R. (2010) Visualizing ribosome biogenesis: parallel assembly pathways for the 30S subunit, *Science*, **330**, 673-677, doi: 10.1126/science.1193220.
56. Nord, S., Bhatt, M. J., Tukenmez, H., Farabaugh, P. J., and Wikstrom, P. M. (2015) Mutations of ribosomal protein S5 suppress a defect in late-30S ribosomal subunit biogenesis caused by lack of the RbfA biogenesis factor, *RNA*, **21**, 1454-1468, doi: 10.1261/rna.051383.115.
57. Sashital, D. G., Greeman, C. A., Lyumkis, D., Potter, C. S., Carragher, B., and Williamson, J. R. (2014) A combined quantitative mass spectrometry and electron microscopy analysis of ribosomal 30S subunit assembly in *E. coli*, *Elife*, **3**, e04491, doi: 10.7554/eLife.04491.
58. Clatterbuck Soper, S. F., Dator, R. P., Limbach, P. A., and Woodson, S. A. (2013) *In vivo* X-ray footprinting of pre-30S ribosomes reveals chaperone-dependent remodeling of late assembly intermediates, *Mol. Cell*, **52**, 506-516, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.020.
59. Wilson, D. N., and Nierhaus, K. H. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 187-219, doi: 10.1080/10409230701360843.
60. Huang, Y. J., Swapna, G. V., Rajan, P. K., Ke, H., Xia, B., Shukla, K., Inouye, M., and Montelione, G. T. (2003) Solution NMR structure of ribosome-binding factor A (RbfA), a cold-shock adaptation protein from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol* , **327**, 521-536, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00061-5.
61. Rubin, S. M., Pelton, J. G., Yokota, H., Kim, R., and Wemmer, D. E. (2003) Solution structure of a putative ribosome binding protein from *Mycoplasma pneumoniae* and comparison to a distant homolog, *J. Struct. Funct. Genom.*, **4**, 235-243, doi: 10.1023/b:jsfg.0000016127.57320.82.
62. Lovgren, J. M., Bylund, G. O., Srivastava, M. K., Lundberg, L. A., Persson, O. P., Wingsle, G., and Wikstrom, P. M. (2004) The PRC-barrel domain of the ribosome maturation protein RimM mediates binding to ribosomal protein S19 in the 30S ribosomal subunits, *RNA*, **10**, 1798-1812, doi: 10.1261/rna.7720204.
63. Leong, V., Kent, M., Jomaa, A., and Ortega, J. (2013) *Escherichia coli* rimM and yjeQ null strains accumulate immature 30S subunits of similar structure and protein complement, *RNA*, **19**, 789-802, doi: 10.1261/rna.037523.112.
64. Grishin, N. V. (2001) KH domain: one motif, two folds, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 638-643, doi: 10.1093/nar/29.3.638.
65. Anantharaman, V., and Aravind, L. (2002) The PRC-barrel: a widespread, conserved domain shared by photosynthetic reaction center subunits and proteins of RNA metabolism, *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0061, doi: 10.1186/gb-2002-3-11-research0061.
66. Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Feng, B., Xu, Y., Muto, A., Himeno, H., Deng, H., Lei, J., and Gao, N. (2013) Dissecting the in vivo assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2609-2620, doi: 10.1093/nar/gks1256.
67. Berti, A. D., Shukla, N., Rottier, A. D., McCrone, J. S., Turner, H. M., Monk, I. R., Baines, S. L., Howden, B. P., Proctor, R. A., and Rose, W. E. (2018) Daptomycin selects for genetic and phenotypic adaptations leading to antibiotic tolerance in MRSA, *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 2030-2033, doi: 10.1093/jac/dky148.
68. Yoshida, H., and Wada, A. (2014) The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 723-732, doi: 10.1002/wrna.1242.
69. Ueta, M., Wada, C., Daifuku, T., Sako, Y., Bessho, Y., et al. (2013) Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria, *Genes Cells*, **18**, 554-574, doi: 10.1111/gtc.12057.
70. Basu, A., Shields, K. E., and Yap, M. F. (2020) The hibernating 100S complex is a target of ribosome-recycling factor and elongation factor G in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, **295**, 6053-6063, doi: 10.1074/jbc.RA119.012307.

HIBERNATION AS A STAGE OF RIBOSOME FUNCTIONING

Review

K. S. Usachev[1], M. M. Yusupov[1,2]*, and Sh. Z. Validov[1]

[1] *Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia; E-mail: marat@igbmc.fr*

[2] *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), 67400 Illkirch-Graffenstaden, France*

Received July 30, 2020
Revised August 28, 2020
Accepted August 28, 2020

In response to stress, eubacteria reduce the level of protein synthesis and either disassemble ribosomes into the 30S and 50S subunits or turn them into translationally inactive 70S and 100S complexes. This helps the cell to solve two principal tasks: (i) to reduce the cost of protein biosynthesis under unfavorable conditions, and (ii) to preserve functional ribosomes for rapid recovery of protein synthesis until favorable conditions are restored. All known genes for ribosome silencing factors and hibernation proteins are located in the operons associated with the response to starvation as one of the stress factors, which helps the cells to coordinate the slowdown of protein synthesis with the overall stress response. It is possible that hibernation systems work as regulators that coordinate the intensity of protein synthesis with the energy state of bacterial cell. Taking into account the limited amount of nutrients in natural conditions and constant pressure of other stress factors, bacterial ribosome should remain most of time in a complex with the silencing/hibernation proteins. Therefore, hibernation is an additional stage between the ribosome recycling and translation initiation, at which the ribosome is maintained in a "preserved" state in the form of separate subunits, non-translating 70S particles, or 100S dimers. The evolution of the ribosome hibernation has occurred within a very long period of time; ribosome hibernation is a conserved mechanism that is essential for maintaining the energy- and resource-consuming process of protein biosynthesis in organisms living in changing environment under stress conditions.

Keywords: ribosome, translation, hibernation, silencing

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1701 – 1717

УДК 577.217.347;577.112.6;577.182.46;004.942

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ХЛОРАМФЕНИКОЛА С РИБОСОМОЙ

© 2020 З.З. Хайруллина[1#], А.Г. Терещенков[2#], С.А. Завьялова[3], Е.С. Комарова[4,5], Д.А. Лукьянов[5], В.Н. Ташлицкий[1], И.А. Остерман[1,5], Н.В. Сумбатян[1]*

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: sumbtyan@belozersky.msu.ru*

[2] *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия*

[3] *Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия*

[4] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119992 Москва, Россия*

[5] *Сколковский институт науки и технологий, 143025 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 13.07.2020
После доработки 07.09.2020
Принята к публикации 09.09.2020

На основе молекулярного докинга проведен виртуальный скрининг всех возможных трипептидных аналогов хлорамфеникола по их аффинности к бактериальной рибосоме. Осуществлен синтез пептидных производных хлорамфениколамина, показавших минимальные расчетные значения энергии взаимодействия с рибосомой. Синтетическим путем получены производные хлорамфениколамина, содержащие в структуре фрагменты антимикробных пролин-богатых пептидов. По вытеснению флуоресцентно-меченного эритромицина из его комплексов с рибосомами показано, что синтезированные пептидные аналоги хлорамфеникола способны связываться с бактериальными рибосомами, все расчетные трипептидные аналоги хлорамфеникола и один из аналогов, содержащий характерный фрагмент из структуры пролин-богатых антимикробных пептидов, проявили аффинность к рибосомам *Escherichia coli*, значительно превышающую таковую исходного антибиотика. Установлено наличие корреляции между рассчитанными и экспериментально полученными значениями эффективности лигандов. В экспериментах по ингибированию биосинтеза белка *in vitro* показано, что аналог RAW-CAM проявляет активность близкую к хлорамфениколу, что подтверждается данными химического пробинга, указывающими на то, что по характеру связывания в рибосомном туннеле этот аналог сходен с немодифицированным хлорамфениколом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, хлорамфеникол, пептидные производные, молекулярный докинг, антимикробные пептиды, рибосомный туннель.

DOI: 10.31857/S0320972520110123

ВВЕДЕНИЕ

В последние два десятилетия с появлением рентгеноструктурных данных и возможностью создания атомных моделей комплексов рибосом с субстратами и белковыми факторами трансляции начался новый этап в изучении механизмов трансляции и её регуляции [1–3]. Важными структурными элементами рибосомы являются пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), катализирующий синтез полипептида, и рибосомный туннель (РТ), обеспечивающий выход синтезируемой цепи из рибосомы [4–6]. Стенки РТ участвуют в мониторинге аминокислотной последовательности перемещающегося вдоль них полипептида [4, 7, 8]. В РТ и ПТЦ

Принятые сокращения: Boc – трет-бутилоксикарбонил; BODIPY – 5,7-диметил-4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен-3-пентановая кислота; CAM – хлорамфениколамин; CHL – хлорамфеникол; DIC – 1,3-диизопропилкарбодиимид; DIPEA – диизопропилэтиламин; DMS – диметилсульфат; ERY – эритромицин; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил; LC-MS – хромато-масс-спектрометрия; MALDI TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией методом матричной десорбции; ONC – онкоцин112 (VDKPPYLPRPRPPRrIYNr-NH_2); **P** – 2-хлортритильный полимер; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; Pip – пиперидин; TFA – трифторуксусная кислота; ДМФА – N,N-диметилформамид; ПбАМП – пролин-богатые антимикробные пептиды; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; РТ – рибосомный туннель; Реагент K – TFA/фенол/вода/тиоанизол/β-меркаптоэтанол = 82,5/5/5/5/2,5, *v/v*.

* Адресат для корреспонденции.

[#] Авторы внесли равный вклад в исследование.

расположены сайты связывания многих антибиотиков, действие которых связано с подавлением процесса бактериальной трансляции, и, как следствие этого, модификация нуклеотидных остатков рРНК и аминокислотных остатков белков, формирующих стенки РТ, приводит к устойчивости бактерий к антибиотикам [9–13]. РТ представляет собой динамическую систему, где осуществляются специфические взаимодействия между пептидной цепочкой, антибиотиками и определенными структурными элементами рибосомы, воздействуя на её функционирование в ряде случаев аллостерически [13–15].

Не так давно было показано, что элементы РТ способны взаимодействовать не только с вновь синтезируемой пептидной цепью, но и с некоторыми антимикробными пептидами, которые попадают в него извне [16–20]. Эти антибактериальные пептиды относятся к классу пролин-богатых пептидов (ПбАМП), последовательности которых обогащены содержанием остатков аргинина, вследствие чего эти пептиды также являются и катионными [21]. Механизм действия ПбАМП определяется тем, что пептиды связываются в РТ бактерий, при этом, как правило, их ориентация противоположна ориентации синтезируемой рибосомой полипептидной цепи – *N*-конец располагается вблизи ПТЦ, а *C*-конец направлен к выходу из РТ, полностью его блокируя. Область связывания ПбАМП в РТ перекрывается с сайтами связывания большинства рибосомных антибиотиков, в частности хлорамфеникола, нацеленных на большую субъединицу рибосомы.

Необходимым условием проявления ингибирующих биосинтез белка свойств соединениями, нацеленными на бактериальную рибосому, является их способность связываться с рибосомой в каком-либо функциональном центре. Однако не всегда высокая аффинность, например синтетических аналогов антибиотиков, приводит к их высокой ингибирующей активности [22, 23]. Так, среди пептидных и аминокислотных аналогов хлорамфеникола были найдены соединения, проявляющие сродство к рибосомам на уровне исходного антибиотика, а в некоторых случаях и значительно превышающее таковое, и в то же время не воздействующих или слабо воздействующих на процесс трансляции [23, 24].

В настоящей работе с целью выявления взаимодействий и свойств, значимых для проявления аффинности к рибосоме и ингибирующей трансляцию активности, осуществлен дизайн, синтез и изучение взаимодействий с рибосомой новых пептидных аналогов хлорамфеникола. Структуры пептидных аналогов хлорамфеникола были выбраны с использованием метода молекулярного докинга с помощью двух подходов (рис. 1, *а–д*). Первый представлял виртуальный скрининг всех возможных трипептидных производных хлорамфениколамина, моделирующих 3′-концевую область пептидил-тРНК. Второй заключался в моделировании аналогов, в которых дихлорацетильный фрагмент хлорамфеникола заменен на короткие последовательности, характерные для ряда природных антимикробных пептидов: онкоцинов, металниковина, бактеницина и их активных синтетических аналогов [25, 26]. В работе измерены константы диссоциации комплексов полученных соединений с рибосомами *Escherichia coli*; в экспериментах по ингибированию биосинтеза белка *in vitro* найдены активные аналоги; методом химического пробинга показано взаимодействие аналогов с нуклеотидами, образующими РТ; с помощью молекулярного докинга предсказаны возможные модели взаимодействия новых соединений с рибосомой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реагенты и растворители: хлорамфеникол («Sigma», Китай), производные L-аминокислот и носитель для твердофазного синтеза, содержащий 2-хлортритилхлоридную группировку (2CTC Resin, «Iris Biotech», Германия), DCC (1,3-дициклогексилкарбодиимид), DIPEA (диизопропилэтиламин), HBTU (O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилуроний гексафторфосфат), HOBt (1-гидроксибензотриазол), N-гидроксисукцинимид, тиоанизол, 9-флуоренилметанол, янтарный ангидрид («Sigma-Aldrich», США, Швейцария, Япония), глутаровый ангидрид («TCI», Япония), DIC (1,3-диизопропилкарбодиимид, «J&K Scientific», США), β-меркаптоэтанол («Ferak Berlin», Германия), TFA и абсолютные растворители: изопропанол, диоксан, ДМФА (N,N-диметилформамид) и CH_2Cl_2 («PanReac AppliChem», США), а также растворители российского производства фирм «Химмед» и «Ирea2000». Флуоресцентное производное эритромицина BODIPY-ERY было синтезировано по известной методике [27], Arg(Pbf)-CAM [24] и N-гидроксисукцинимидный эфир уксусной кислоты получали, как описано ранее [28].

Хроматография. ***ТСХ*** проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 («Merck», Германия); для ***колоночной хроматографии*** использовали Silica gel 60 (0,063–0,200 мм и 0,04–0,063 мм,

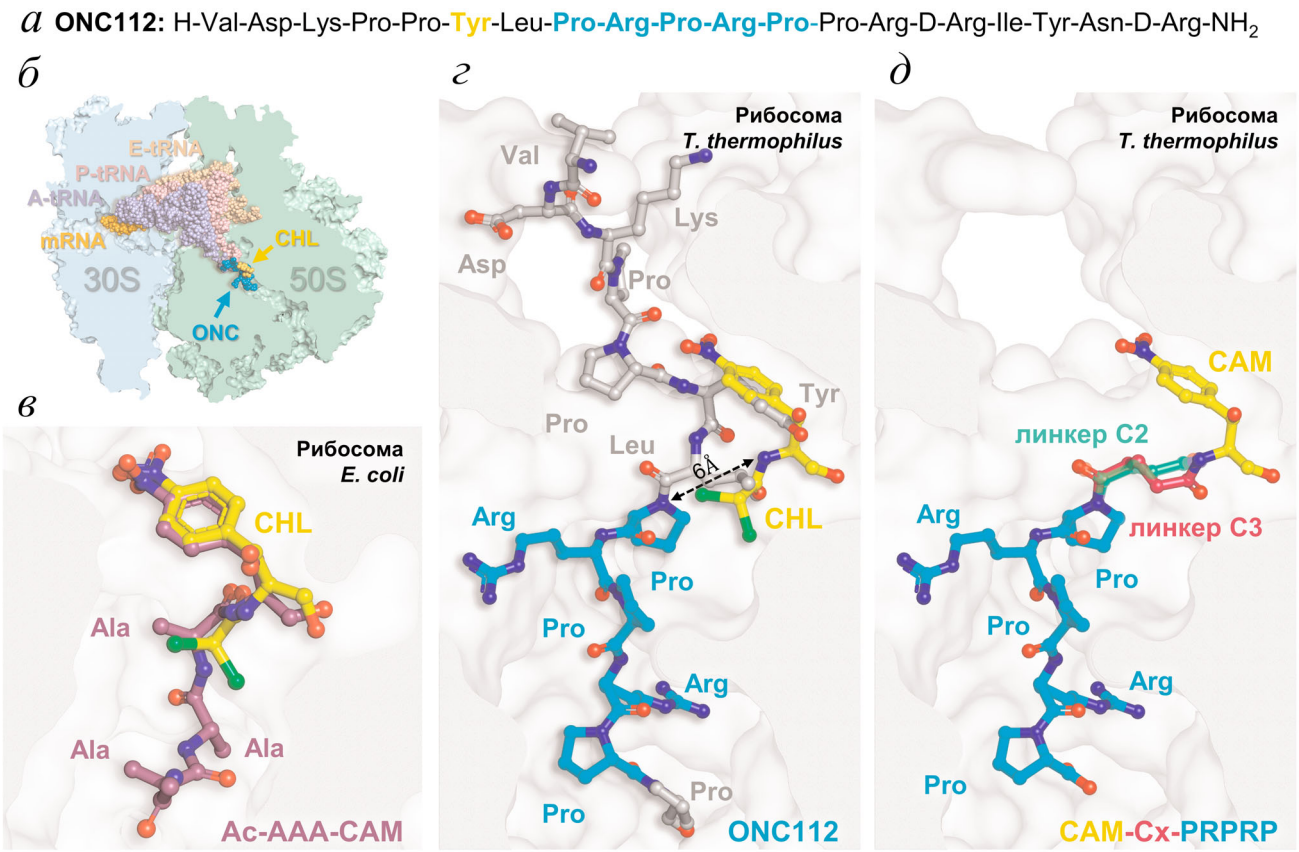


Рис. 1. Связывание хлорамфеникола, онкоцина112 и их производных с бактериальной рибосомой. *а* – Аминокислотная последовательность антимикробного пептида онкоцина112. Желтым выделена аминокислота, попадающая в сайт связывания хлорамфеникола, голубым – пептидная последовательность, предложенная для модификации хлорамфеникола. *б* – Схематичное отображение сайтов связывания хлорамфеникола (CHL, желтый) и онкоцина (ONC112, голубой) с рибосомой *Thermus thermophilus* (PDB ID: 4Z8C) [16]. *в* – Наложение структуры комплекса хлорамфеникола (желтый) с рибосомой *E. coli* (PDB ID: 4V7T) [15] и структуры пептидного аналога хлорамфеникола Ac-AAA-CAM (4a) (фиолетовый), полученной методом молекулярного докинга. *г* – Наложение структуры комплекса хлорамфеникола (желтый, PDB ID: 6ND5 [38]) и онкоцина (серый и голубой, PDB ID: 4Z8C [16]) с рибосомой *T. thermophilus*. Голубым цветом отмечена пептидная последовательность $Pro^8Arg^9Pro^{10}Arg^{11}Pro^{12}$, предложенная для модификации хлорамфеникола. *д* – Модель конъюгата хлорамфениколамина (CAM, желтый) с фрагментом онкоцина$^{8–12}$ (голубой), соединенные линкерами разной длины – бутандиовой (зеленый) и пентандиовой (розовый) кислотами в комплексе с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C) [16]

«Marcherey Nagel», Германия). Соединения, содержащие группы, поглощающие в УФ-области, обнаруживали с помощью УФ-кабинета («Camag», Англия); соединения, содержащие свободные либо трет-бутилоксикарбонил-защищенные (Boc-защищенные) аминогруппы, обнаруживали с помощью нингидринового реактива; для детекции соединений, содержащих остатки аргинина со свободной гуанидиновой группой и триптофана, применяли реагенты Сакагучи и Эрлиха соответственно.

Аминокислотный анализ осуществляли на анализаторе «Hitachi 835», Япония. Кислотный гидролиз проводили в запаянных ампулах смесью 6 M HCl и трифторуксусной кислот (2/1) при 155 °C в течение 1 часа.

Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе «Knauer», Германия, используя колонку Nucleodur 100-5 C18 (5 мкм, 10 × 250 мм) («Macherey Nagel», Германия) в градиенте 0–60% ацетонитрила в 0,1 M ацетате аммония, скорость элюции – 5 мл/мин. Лиофилизацию проводили на приборе «FreeZone 2.5 Liter Freeze Dry System» («Labconco», Швейцария) при давлении ~10^{-5} атм.

Спектры ЯМР соединений регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 («Bruker», Германия), рабочие частоты составляли 400 МГц – для ^{1}H и 101 МГц – для ^{13}C.

Хромато-масс-спектрометрию (LC-MS) осуществляли с помощью системы UPLC/MS/MS, состоящей из хроматографа Acquity UPLC

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

Спектры MALDI-TOF MS получали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре «UltrafleXtreme», («Bruker Daltonik GmbH», Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона.

Поляризацию флуоресценции измеряли при комнатной температуре с помощью планшетного мультиридера «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader» («Perkin Elmer», США) на 384-луночном планшете. Длина волны поглощения составляла 485 нм, испускания – 535 нм.

Виртуальный скрининг и молекулярный докинг. ***Виртуальный скрининг*** проводили методом молекулярного докинга лигандов в жесткую структуру рецептора. Для этого структуры пептидных аналогов хлорамфеникола были сгенерированы, исходя из SMILES формата записи молекул с помощью программы OpenBabel 2.3.2 [29]. Всего было рассмотрено 10 648 вариантов N-ацетилированных трипептидных аналогов хлорамфеникола, включающих таутомерные формы гистидина и аргинина. Структуры лигандов, содержащие фрагменты онкоцина, дополнительно были оптимизированы полуэмпирическим методом в программе MOPAC2016 с использованием гамильтониана PM7 [30]. В качестве рецептора использовали кристаллические структуры 70S рибосомы *E. coli* в комплексе с хлорамфениколом (PDB ID: 4V7T) [15] и комплекс 70S рибосомы *Thermus thermophilus* с онкоцином112 (PDB ID: 4Z8C) [16], из которых удаляли все неорганические ионы, низкомолекулярные лиганды и молекулы воды.

Молекулярный докинг выполняли с помощью программного обеспечения Autodock Vina [31] и QuickVina 2 [32]. Область молекулярного докинга охватывала сайт связывания хлорамфеникола и верхнюю часть PT и описывалась кубом с длиной ребра 30 Å (в случае трипептидных аналогов хлорамфеникола) и параллелепипедом величиной 40 × 30 × 30 Å (в случае аналогов хлорамфеникола, содержащих фрагменты онкоцина). Параметр «exhaustiveness», характеризующий точность и полноту расчетов, был равен 100 при скрининге трипептидных аналогов и 600 – для соединений, содержащих фрагменты онкоцина. Для каждого соединения были получены по 20 возможных конформаций, характеризующихся соответствующими энергиями взаимодействия. Дополнительно было рассчитано среднеквадратичное отклонение амфеникольной части молекулы от рентгеноструктурных данных комплекса хлорамфеникола с рибосомой. Визуализацию полученных данных проводили с помощью программы PyMol 2.4.

Синтез пептидных производных хлорамфениколамина. ***Синтез*** пептидов и их производных **1c–4c**, **1d–4d**, **1e–2e**, **2f**, *флуоренилметилового эфира бутандиовой* (**5d**) и *флуоренилметилового эфира пентандиовой кислот* (**5e**), пептидил-полимеров *ProArg(Pbf)Pro-**P*** (**5c**), *ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-**P*** (**6c**), пентапептида *Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-OH* (**7c**) и модифицированного им β-аланилхлорамфениколамина *Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-βAla-CAM* (**7a**) описан в Приложении (http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya).

Гидрохлорид (1R,2R)-2-амино-1-(4-нитрофенил)пропан-1,3-диола (гидрохлорид хлорамфениколамина, CAM·HCl), 3-амино-N-[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]пропанамид (β-Ala-CAM, ***7b***), а также аргинин содержащее производное хлорамфениколамина *Arg(Pbf)-CAM* были синтезированы, согласно описанным ранее в литературе методикам [33, 24].

N-ацетил-L-фенилаланил-L-триптофил-L-гистидил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-FWH-CAM, ***1a***). К холодному раствору 25,0 мг (48 мкмоль) Ac-PheTrpHis-OH (**1d**) и 7,1 мг (62 мкмоль) HOSu (N-гидроксисукцинимид) в 2 мл ДМФА (безв.) добавляли 12,8 мг (62 мкмоль) DCC при 0 °C. Смесь перемешивали в течение 2 ч при 0 °C, затем в течение ночи при 4 °C. Далее добавляли к раствору 11,9 мг (48 мкмоль) CAM·HCl и 8,3 мкл (48 мкмоль) DIPEA в 1 мл ДМФА. Полученную смесь перемешивали в течение 7 ч при комнатной температуре, затем в течение ночи при 4 °C. Реакционную смесь разбавляли водой (15 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Органический слой сушили Na_2SO_4 (безв.), а затем концентрировали на роторном испарителе. Продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 6/1/0,1. Выход: 4,7 мг (14%); ТСХ: R_f 0,24 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 6/1/0,1), R_f 0,51 ($CHCl_3$/MeOH = 4/1); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{37}H_{40}N_8O_8 + H]^+$ – 725,3; найдено 725,3; t_R = 1,50 мин.

L-фенилаланил-L-триптофил-L-гистидил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (FWH-CAM, ***1b***). Раствор, состоящий из 825 мкл TFA, 50 мкл фенола, 50 мкл воды, 50 мкл тиоанизола и 25 мкл β-меркаптоэтанола (Реагент K), дегазировали с помощью барботирования азота в течение нескольких минут. Полученную смесь добавляли к 10 мг (12,8 мкмоль) Boc-PheTrpHis-CAM (**1c**) и перемешивали в течение 4 ч при комнатной тем-

пературе в атмосфере азота. Смесь упаривали на роторном испарителе, остаток растворяли в минимальном количестве воды и осаждали эфиром. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 6/1/0,1. Выход: 6,4 мг (74%); ТСХ: R_f 0,26 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 6/1/0,1); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{35}H_{38}N_8O_7 + H]^+$ – 683,3; найдено 683,3; t_R = 1,04 мин.

N-ацетил-L-аргинил-L-аланил-L-триптофил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-RAW-CAM, ***2a***) получали подобно **1b**, исходя из 12,1 мг (13,2 мкмоль) Ac-Arg(Pbf)AlaTrp-CAM (**2c**) и 500 мкл Реагента K. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4. Выход: 4,9 мг (56%); ТСХ: R_f 0,09 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{31}H_{41}N_9O_8 + H]^+$ – 668,3; найдено 668,4; t_R = 1,00 мин.

L-аргинил-L-аланил-L-триптофил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (RAW-CAM, ***2b***) получали подобно **1b**, исходя из 15 мг (17,1 мкмоль) Arg(Pbf)AlaTrp-CAM (**2d**) и 500 мкл Реагента K. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4. Выход: 4,6 мг (43%); ТСХ: R_f 0,10 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{29}H_{39}N_9O_7 + H]^+$ – 626,3; найдено 626,3; t_R = 0,80 мин.

N-ацетил-L-валил-L-фенилаланил-L-аргинил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-VFR-CAM, ***3a***). К раствору 9,5 мг (26,9 мкмоль) VFR-CAM (**3b**) в 1 мл ДМФА добавляли 4,2 мг (26,9 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира уксусной кислоты и 4,7 мкл (26,9 мкмоль) DIPEA. Смесь перемешивали 1 час при комнатной температуре, а затем ночь при 4 °C. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = = 65/25/4. Выход: 6,1 мг (35%); ТСХ (Al_2O_3): R_f 0,40 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{31}H_{44}N_8O_8 + H]^+$ – 657,3; найдено 657,2; t_R = 1,44 мин.

L-валил-L-фенилаланил-L-аргинил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (VFR-CAM, ***3b***) получали подобно **1b**, исходя из 26 мг (26,9 мкмоль) Boc-ValPheArg(Pbf)–CAM (**3c**) и 500 мкл Реагента K. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 6/1/0,1. Выход: 16 мг (97%); ТСХ (Al_2O_3): R_f 0,41 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 6/1/0,1); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{29}H_{42}N_8O_7 + H]^+$ – 615,3; найдено 615,2; t_R = 0,80 мин.

N-ацетил-L-аланил-L-аланил-L-аланил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-AAA-CAM, ***4a***) получали подобно **3a**, исходя из 7,5 мг (17,6 мкмоль) AAA-CAM (**4b**), 3,0 мг (19,4 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира уксусной кислоты и 2,5 мкл (17,6 мкмоль) триэтиламина. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе CH_2Cl_2/MeOH/19% NH_4OH = = 65/25/4. Выход: 7,7 мг (94%); ТСХ: R_f 0,81 (CH_2Cl_2/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{20}H_{29}N_5O_8 + Na]^+$ – 490,2; найдено 490,2; t_R = 0,87 мин.

L-аланил-L-аланил-L-аланил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (AAA-CAM, ***4b***). К 19,5 мг (37,1 мкмоль) Boc-AlaAlaAla-CAM (**4c**) добавляли 1 мл смеси TFA/CH_2Cl_2 (1/1) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Далее смесь упаривали на роторном испарителе, остаток осаждали эфиром. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе $CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4. Выход: 13,1 мг (83%); ТСХ: R_f 0,69 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = 65/25/4); ESI-MS, m/z вычислено для $[C_{18}H_{27}N_5O_7 + H]^+$ – 426,2; найдено 426,3.

N^1-[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-N^4-L-пролил-L-аргинил-L-пролин-бутандиамид (CAM-C2-PRP, ***5a***). Флуоренилметиловый эфир бутандиовой (**5d**) кислоты (3 экв.) и HBTU (3 экв.) перемешивали в ДМФА в течение 5 мин. Далее полученный активированный эфир и DIPEA (3 экв.) добавляли к 1 экв. пептидил-полимера ProArg(Pbf)Pro-**P** (**5c**) в сосуде Меррифилда. Перемешивали смесь 10 мин и добавляли DIPEA (0,6 экв.), затем продолжали перемешивание в течение 5 ч. Далее растворитель удаляли и промывали полимер, чередуя ДМФА (2 × 1 мин) и пропанол-2 (2 × 1 мин), после чего добавляли свежеприготовленный раствор для кэпирования (10 мл/г полимера): уксусный ангидрид/DIPEA/ДМФА = = 5/6/89, *v/v*, выдерживали смесь в течение 5 мин, затем отфильтровывали полимер, заливали аналогичной порцией раствора для кэпирования и выдерживали ещё 30 мин. Затем полимер отфильтровывали и промывали ДМФА (3 × 1 мин). Удаляли 9-флуоренилметильную группу обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФА (2 × 15 мин), промывали полимер ДМФА (3 × 1 мин). Далее добавляли раствор HOSu (3 экв.) и DIC (3 экв.) в ДМФА и переме-

шивали 3 ч. Растворитель удаляли, добавляли к полимеру раствор CAM·HCl (3 экв.) и DIPEA (3 экв.) в ДМФА и перемешивали 3 ч. Далее синтезированное производное хлорамфениколамина отщепляли от полимерного носителя, согласно следующему протоколу: промывали последовательно полимер ДМФА (3 × 1 мин) и CH_2Cl_2 (3 × 1 мин); добавляли Реагент K (10 мл/г полимера) и перемешивали в течение 4 ч; после чего полимер фильтровали и высаживали продукт из фильтрата диэтиловым эфиром. Обработку полимера Реагентом K и высаживание продукта повторяли до полного отщепления продукта (контроль осуществляли по ТСХ). Выпавшие осадки объединяли и подвергали очистке с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход: 4,5 мг (9%); ВЭЖХ: t_R = 12,98 мин; MALDI TOF MS, m/z вычислено для $[C_{29}H_{43}N_8O_{10} - NO_2 + NH\text{-}OH + H]^+$ – 649,3; найдено 649,5; m/z вычислено для $[C_{29}H_{42}N_8O_{10} - NO_2 + NH_2 + H]^+$ – 633,3; найдено 633,5; аминокислотный анализ: Arg 1,00 (1), Pro 1,51 (2).

N^1-[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-N^4-L-пролил-L-аргинил-L-пролин-пентандиамид (CAM-C3-PRP, ***5b***) получали аналогично **5a**, исходя из пептидил-полимера ProArg(Pbf)Pro-**P** (**5c**) и флуоренилметилового эфира пентандиовой кислоты (**5e**). Выход: 4,1 мг (8%); ВЭЖХ: t_R = 3,76 мин; LC-MS, m/z вычислено для $[C_{30}H_{44}N_8O_{10} + H]^+$ – 677,3; найдено 677,5; t_R = 0,95 мин; аминокислотный анализ: Arg 1,00 (1), Pro 2,11 (2).

N^1-[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-N^4-L-пролил-L-аргинил-L-пролил-L-аргинил-L-пролин-бутандиамид (CAM-C2-PRPRP, ***6a***) получали аналогично **5a**, исходя из пептидил-полимера ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-**P** (**6c**) и флуоренилметилового эфира бутандиовой кислоты (**5d**). Выход: 3,8 мг (6%); ВЭЖХ: t_R = 16,24 мин; MALDI TOF MS, m/z вычислено для $[C_{40}H_{61}N_{13}O_{12} + H]^+$ – 916,5; найдено 916,6; m/z вычислено для $[C_{40}H_{61}N_{13}O_{12} - NO_2 + NH\text{-}OH + H]^+$ – 902,5; найдено 902,6; m/z вычислено для $[C_{40}H_{61}N_{13}O_{12} - NO_2 + NH_2 + H]^+$ – 886,5; найдено 886,6; аминокислотный анализ: Arg 2,00 (2), Pro 3,12 (3).

N^1-[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-N^4-L-пролил-L-аргинил-L-пролил-L-аргинил-L-пролин-пентандиамид (CAM-C3-PRPRP, 6b) получали аналогично **5a**, исходя из пептидил-полимера ProArgProArgPro-**P** (**6c**) и флуоренилметилового эфира пентандиовой кислоты (**5e**). Выход: 3,2 мг (5%); ВЭЖХ: t_R = 19,67 мин; MALDI TOF MS, m/z вычислено для $[C_{41}H_{63}N_{13}O_{12} - NO_2 + NH\text{-}OH + H]^+$ – 916,5; найдено 916,6; m/z вычислено для $[C_{41}H_{63}N_{13}O_{12} - NO_2 + NH_2 + H]^+$ – 900,5; найдено 900,6; аминокислотный анализ: Arg 2,00 (2), Pro 3,22 (3).

N-ацетил-L-пролил-L-аргинил-L-пролил-L-аргинил-L-пролил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-PRPRPβA-CAM, 7) получали аналогично **1b**, исходя из 40 мг (0,028 ммоль). Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-β-Ala-CAM (**7a**) и 1 мл Реагента K. Выход: 21 мг (80%); ТСХ: R_f 0,12 ($CHCl_3$/MeOH/19% NH_4OH = = 65/25/5); LC-MS, m/z вычислено для $[C_{41}H_{64}N_{14}O_{11} + 2H]^{2+}$ – 465,3; найдено 465,7; t_R = 0,69 мин.

Изучение связывания аналогов хлорамфеникола с рибосомами *E. coli*. Аффинность соединений к 70S рибосомам *E. coli* (штамм MRE-600) определяли методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентного аналога эритромицина – BODIPY-ERY, как было описано ранее [34, 24]. Концентрация BODIPY-ERY составляла 4 нМ, рибосом – 30 нМ. Концентрации исследуемых веществ варьировали (0,05–1000 мкМ). Смесь инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем измеряли уровень поляризации флуоресценции. Значения поляризации флуоресценции были приведены к относительной шкале, для чего за 100% был принят сигнал в отсутствие исследуемых соединений, а за 0% – при полном вытеснении BODIPY-ERY избытком эритромицина. Для каждого вещества проводили минимум по 2 повтора. Расчет эффективных констант диссоциации проводили на основе стандартной модели, описывающей равновесное конкурентное связывание двух лигандов в одном сайте [35].

***In vitro* трансляция.** Ингибирование синтеза белка в бесклеточной системе проводили при помощи набора PurExpress («NEB», США), согласно предложенному протоколу. В качестве матрицы для трансляции использовали 100 нг мРНК гена *dhfR*, предварительно полученной T7 транскрипцией (T7 Mega script, «Invitrogen», США) с контрольной плазмиды набора PurExpress; реакцию проводили в 5 мкл в течение часа. Для визуализации белка в геле добавляли в реакционную смесь BODIPY-Met-tRNA до 1 мкМ. Тестируемые антибиотики добавляли в концентрации 30 мкМ. Реакции проводили в трех повторах и разделяли смеси в 12%-ном SDS-геле, затем проводили детекцию сигнала BODIPY при помощи Typhoon phosphorimager («GE», США). Обсчёт сигнала проводили при помощи ImageLab («Bio-rad», США).

Химический пробинг. Определение нуклеотидов рРНК, взаимодействующих с антибиотиками, осуществляли при помощи анализа эффективности защиты от химической модификации. Образцы 70S рибосом *E. coli* в присутствии

30 мкМ тестируемых антибиотиков подвергали действию диметилсульфата (DMS), согласно классическому протоколу Moazed и Noller [36, 37], для обратной транскрипции был использован олигонуклеотид, комплементарный участку 2,102–2,119 23S рРНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Виртуальный скрининг и молекулярный докинг. Для отбора наиболее аффинных по отношению к рибосоме аналогов хлорамфеникола, в структуре которых дихлорацетильная группа заменена на трипептид, был проведен виртуальный скрининг всех возможных комбинаций N-ацетилтрипептидных производных хлорамфениколамина, исходя из 20 протеиногенных аминокислот. Ацетильная группа была введена для исключения возможного влияния концевой аминогруппы и выявления взаимодействий, специфичных для боковых радикалов аминокислот. Виртуальный скрининг проводили методом молекулярного докинга сгенерированных лигандов в структуру рибосомы *E. coli* в комплексе с хлорамфениколом (PDB ID: 4V7T) [15]. В результате было получено по 20 возможных конформаций для каждого из 8000 производных и оценена их энергия взаимодействия с рибосомой. Отдельно была произведена оценка отклонения хлорамфеникольной части молекул от рентгеноструктурных данных комплекса хлорамфеникола с рибосомой. Во многих из полученных конформаций нитрофенильный остаток мало смещается относительно соответствующей кристаллической структуры хлорамфеникола, в то время как пептидная цепь направлена в сторону PT (рис. 1, *в*). Анализ результатов виртуального скрининга (рис. S1 в Приложении) показал, что наиболее выгодными аминокислотами в любом из положений по отношению к хлорамфениколамину являются содержащие ароматические группы Trp, Tyr, Phe, а также His.

Таблица 1. Полученные методом молекулярного докинга энергии взаимодействия трипептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомой *E. coli*

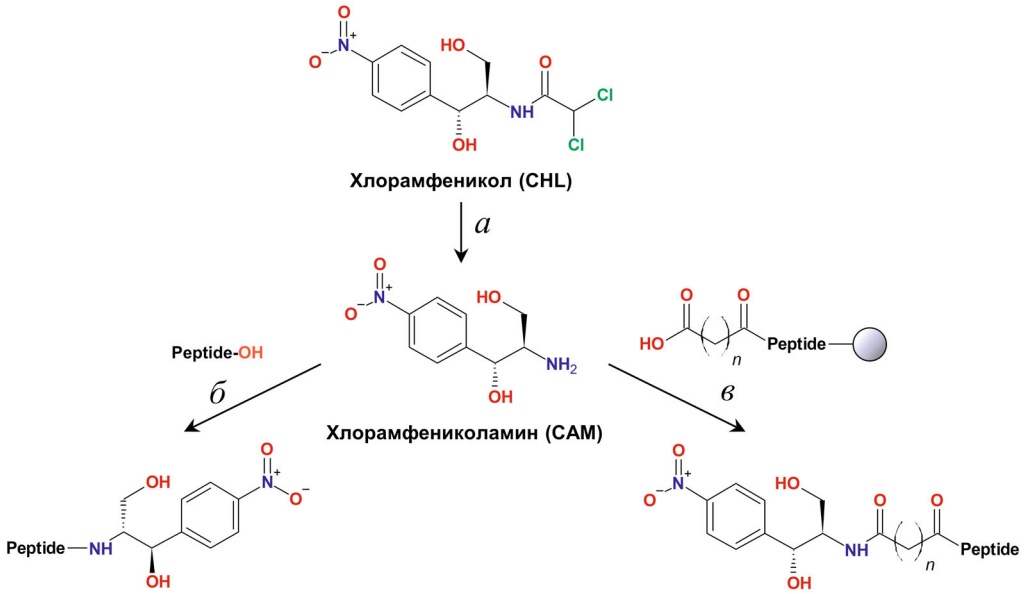
Соединение	Энергия связывания, ккал/моль
Ac-FWH-CAM (1a)	–14,1
Ac-RAW-CAM (2a)	–12,3
Ac-VFR-CAM (3a)	–12,3
Ac-AAA-CAM (4a)	–9,2
Хлорамфеникол	–8,2

Для дальнейшего синтеза были выбраны трипептидные аналоги Ac-FWH-CAM (**1a**), Ac-RAW-CAM (**2a**), Ac-VFR-CAM (**3a**) (рис. 2), находящиеся среди 50 лучших производных, ранжированных по рассчитанной энергии взаимодействия с рибосомой (табл. 1), а также их производные со свободной *N*-концевой аминогруппой: FWH-CAM (**1b**), RAW-CAM (**2b**), VFR-CAM (**3b**). Выбор данных соединений также был обусловлен тем, что они содержат в своём составе либо положительно заряженную аминокислоту Arg либо His, способный легко переходить в протонируемую форму при физиологических условиях. Триаланиновые аналоги Ac-AAA-CAM (**4a**) и AAA-CAM (**4b**) были предложены в качестве контрольных соединений.

Дизайн аналогов хлорамфеникола, содержащих фрагменты онкоцина, проводили на основании наложения кристаллических структур хлорамфеникола (PDB ID: 6ND5) [38] и онкоцина112 (PDB ID: 4Z8C) [16] в комплексах с рибосомами *T. thermophilus*, ввиду отсутствия структурных данных для комплекса рибосомы *E. coli* с онкоцином. Принимая во внимание высокую консервативность фрагмента 23S рРНК, локализованного в области связывания антибиотиков, а также сходство конформаций хлорамфеникола, связанного с различными рибосомами [15, 38], можно сделать предположение об аналогичном взаимодействии моделируемых аналогов как с рибосомами *E. coli*, так и с *T. thermophilus*. Анализ наложения структур (рис. 1, *г*) показал, что аминогруппа хлорамфениколамина находится на расстоянии 6 Å от α-иминогруппы Pro^8 онкоцина. В качестве линкеров, соединяющих данные группы, были предложены линейные двухосновные кислоты, длина которых была выбрана на основе результатов виртуального скрининга конъюгатов хлорамфениколамина с фрагментами онкоцина (рис. S2, a-e в Приложении), в которых варьировалась как длина цепи двухосновной кислоты (от пропан- до гександиовой кислоты), выступающей в качестве линкера (рис. S2c в Приложении), так и длина фрагментов онкоцина (рис. S2, d в Приложении). В литературе имеются данные о том, что основной вклад в связывание онкоцина с PT вносят первые 12 а.о. ($Val^1Asp^2Lys^3Pro^4Pro^5Tyr^6Leu^7Pro^8Arg^9Pro^{10}Arg^{11}Pro^{12}$) [16, 17], поэтому рассматривались фрагменты онкоцина от одной (Pro^8) до пяти ($Pro^8Arg^9Pro^{10}Arg^{11}Pro^{12}$) аминокислот. Наибольшей по результатам молекулярного докинга аффинностью к рибосоме (рис. S2b в Приложении) обладали конъюгаты хлорамфениколамина с фрагментами онкоцина, в структуре которых линкер содержал две (CAM-C2-$ONC^{8–12}$)

или три метиленовые группы (CAM-C3-ONC$^{8-12}$) (рис. 1, *д*). Для дальнейшего синтеза были выбраны пептидные аналоги хлорамфеникола, в которых трипептид (Pro^{8}Arg^{9}Pro^{10}) и пентапептид (Pro^{8}Arg^{9}Pro^{10}Arg^{11}Pro^{12}) соединены с хлорамфениколамином через бутандиовую либо пентандиовую кислоты: CAM-Cn-PRP (n = 2, **5a**, n = 3, **5b**), CAM-Cn-PRPRP (n = 2, **6a**, n = 3, **6b**) (рис. 2). Поскольку выбранные пептидные последовательности являются палиндромными, был также предложен аналог хлорамфеникола, содержащий в структуре пентапептидный фрагмент с направлением цепи, обратным по отношению к последовательности онкоцина; в структуре этого аналога аминогруппа хлорамфениколамина соединена с карбоксильной группой *C*-концевого пролина через остаток β-аланина: Ac-PRPRPβA-CAM (**7**) (рис. 2).

Синтез. Были синтезированы новые пептидные аналоги хлорамфениколамина, структуры которых были выбраны на основе виртуального скрининга: Ac-FWH-CAM (**1a**), Ac-RAW-CAM (**2a**), Ac-VFR-CAM (**3a**) и Ac-AAA-CAM (**4a**), а также их аналоги со свободной *N*-концевой аминогруппой (FWH-CAM (**1b**), RAW-CAM (**2b**), VFR-CAM (**3b**), AAA-CAM (**4b**)). Схема синтеза соединений (**1**–**4**) включала гидролиз хлорамфеникола до хлорамфениколамина [33] и ацилирование последнего с помощью защищенных по боковым функциональным группам N-Boc-, N-Fmoc- либо N-ацетил-пептидов с последующим удалением защитных групп (рис. 2). В случае соединений **2a**, **3a** и **4a** ацетилирование трипептидных аналогов хлорамфеникола, содержащих свободную *N*-концевую аминогруппу, проводили обработкой их N-оксисукцинимидным эфиром уксусной кислоты. Соединения **3a** и **3b** получали присоединением к хлорамфениколамину сукцинимидного эфира защищенного по аминогруппе и боковой функции



Peptide	*R* = Ac	*R* = H
R-PheTrpHis-	**1a**	**1b**
R-ArgAlaTrp-	**2a**	**2b**
R-ValPheArg-	**3a**	**3b**
R-AlaAlaAla-	**4a**	**4b**
R-ProArgProArgPro-βAla-	**7**	-

Peptide	*n* = 2	*n* = 3
-ProArgPro-OH	**5a**	**5b**
-ProArgProArgPro-OH	**6a**	**6b**

Рис. 2. Схема синтеза пептидных аналогов хлорамфеникола. *а* – 1M HCl, 100 °C; *б* – **1a**: Ac-PheTrpHis-OSu; **1b**: 1) Boc-PheTrpHis-OSu, 2) Реагент K; **2a**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)AlaTrp-OSu, 2) Pip, 3) AcOSu, 4) Реагент K; **2b**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)AlaTrp-OSu, 2) Pip, 3) Реагент K; **3a**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)-OSu, 2) Pip, 3) Boc-ValPhe-OSu, 4) Реагент K, 5) AcOSu; **3b**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)-OSu, 2) Pip, 3) Boc-ValPhe-OSu, 4) Реагент K; **4a**: 1) Boc-AlaAlaAla-OSu, 2) TFA, 3) AcOSu; **4b**: 1) Boc-AlaAlaAla-OSu, 2) TFA; *в* – **5a**: 1) SuO-C(O)$(CH_2)_2$C(O)-ProArg(Pbf)Pro-**P**, 2) Реагент K; **5b**: 1) SuO-C(O)$(CH_2)_3$C(O)-ProArg(Pbf)Pro-**P**, 2) Реагент K; **6a**: 1) SuO-C(O)$(CH_2)_2$C(O)-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-**P**, 2) Реагент K; **6b**: 1) SuO-C(O)$(CH_2)_3$C(O)-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-**P**, 2) Реагент K; **7**: 1) Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-OSu, 2) Реагент K

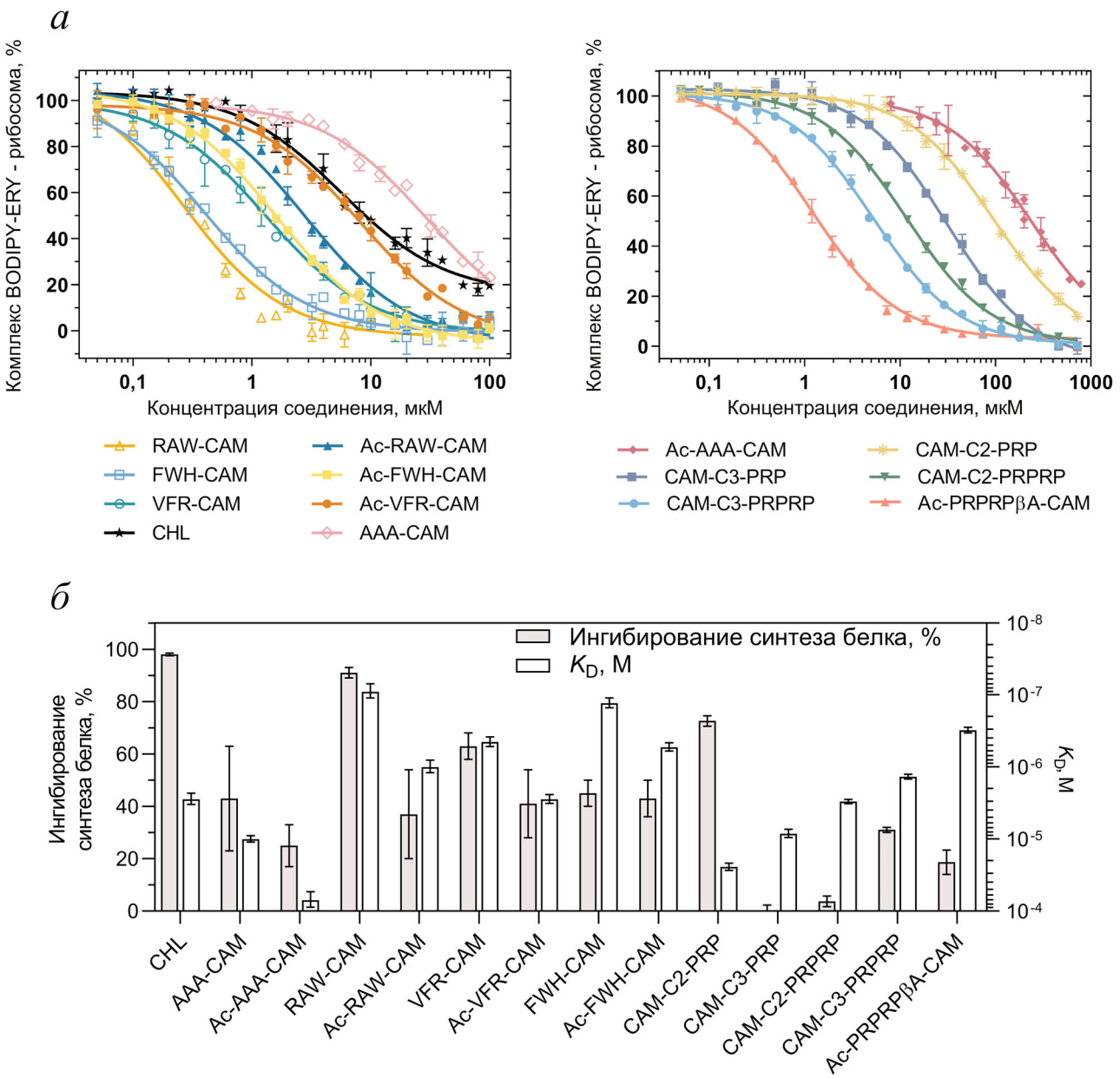


Рис. 3. Аффинность к рибосоме и ингибирующая активность пептидных аналогов хлорамфеникола. *а* – Конкурентное связывание BODIPY-ERY и пептидных аналогов хлорамфеникола с 70S рибосомами *E. coli*. Для каждой точки приведено среднее значение со стандартным отклонением. *б* – Способность пептидных аналогов хлорамфеникола ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro* и эффективные константы диссоциации (K_D) их комплексов с рибосомами. Приведены средние значения с доверительным интервалом (α = 0,05)

аргинина, с последующим удалением Fmoc-группы с его аминогруппы и присоединением к ней дипептида Boc-ValPhe.

Для получения производных хлорамфениколамина, содержащих в структуре характерные последовательности из ПбАМП: CAM-C2-PRP (**5a**), CAM-C3-PRP (**5b**), CAM-C2-PRPRP (**6a**) и CAM-C3-PRPRP (**6b**), была разработана схема твердофазного синтеза, позволяющая получить не только пептидные фрагменты, но и полностью синтезировать конъюгаты хлорамфениколамина с фрагментами онкоцина на твердофазном носителе (рис. 2 и рис. S3 в Приложении). Синтез пептидов проводили согласно стандартной Fmoc-стратегии с использованием Pbf-группы для защиты боковой цепи аргинина. После достижения необходимой длины пептидного фрагмента к нему присоединяли моно-9-

Таблица 2. Эффективные константы диссоциации комплексов пептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомами *E. coli*. Приведены средние значения с доверительным интервалом (α = 0,05)

Соединение	K_D, мкМ	Соединение	K_D, мкМ
Ac-FWH-CAM (**1a**)	0,54 ± 0,06	FWH-CAM (**1b**)	0,13 ± 0,02
Ac-RAW-CAM (**2a**)	1,0 ± 0,2	RAW-CAM (**2b**)	0,09 ± 0,02
Ac-VFR-CAM (**3a**)	2,8 ± 0,4	VFR-CAM (**3b**)	0,45 ± 0,07
Ac-AAA-CAM (**4a**)	80 ± 20	AAA-CAM (**4b**)	10 ± 1
CAM-C2-PRP (**5a**)	24 ± 3	CAM-C3-PRP (**5b**)	8 ± 1
CAM-C2-PRPRP (**6a**)	3,0 ± 0,2	CAM-C3-PRPRP (**6b**)	1,4 ± 0,1
Ac-PRPRPβA-CAM (**7**)	0,31 ± 0,03		
Хлорамфеникол	2,8 ± 0,5		

флуоренилметиловый эфир бутандиовой (**5d**) либо пентандиовой кислоты (**5e**), которые получали заранее [39]. После удаления флуоренилметиловой группировки с карбоксильной группы последнюю активировали с помощью N-гидроксисукцинимида и DIC, а затем присоединяли хлорамфениколамин [23], после чего деблокировали конъюгат с одновременным отщеплением его от полимерного носителя.

Для получения соединения Ac-PRPRPβA-CAM (**7**) хлорамфениколамин предварительно модифицировали с помощью Boc-β-Ala, удаляли Boc-группу [24, 40], а затем модифицировали по образовавшейся аминогруппе пептидом Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-OH (**7c**) и удаляли Pbf-защиты с остатков аргинина (рис. 2). Синтез пептида **7c** был предварительно осуществлен на твердой фазе, для сохранения защитных боковых групп его отщепляли от 2-хлортритильного полимера с применением гексафторизопропанола (рис. S3 в Приложении) [41].

Изучение связывания аналогов хлорамфеникола с рибосомами *E. coli*. Аффинность полученных соединений к рибосоме была измерена с помощью метода конкурентного связывания в присутствии флуоресцентно-меченного производного эритромицина – BODIPY-ERY, поскольку известно, что сайты связывания хлорамфеникола и эритромицина перекрываются [38]. Для всех изучаемых пептидных аналогов хлорамфеникола наблюдалось падение поляризации флуоресценции при увеличении их концентрации (рис. 3, *a*), что говорит о способности конъюгатов вытеснять BODIPY-ERY из его сайта связывания, находящегося в рибосомном туннеле. Нелинейный регрессионный анализ полученных данных [35] позволил рассчитать эффективные константы диссоциации (K_D) комплексов аналогов хлорамфеникола с рибосомами (табл. 2).

Согласно представленным результатам (табл. 2), все выбранные на основании виртуального скрининга трипептидные аналоги хлорамфеникола проявляют бóльшую или сравнимую с хлорамфениколом аффинность к рибосоме. Соединения со свободной *N*-концевой аминогруппой обладают в несколько раз большим сродством к рибосоме по сравнению с их N-ацетилированными производными; подобное явление ранее наблюдалось для аминокислотных аналогов хлорамфеникола [24]. Аффинность RAW-CAM (**2b**) к рибосоме оказалась более чем в 20 раз выше, чем у хлорамфеникола. В то же время трипептидные аналоги, выбранные в качестве контроля – Ac-AAA-CAM (**4a**) и AAA-CAM (**4b**), не показали значимого связывания в области рибосомного туннеля.

Введение в структуру хлорамфениколамина фрагментов онкоцина в некоторых случаях также привело к компенсации потери прочных взаимодействий, обусловленных дихлорацетильной группой [33, 38]. Производные хлорамфениколамина, содержащие фрагменты онкоцина, связанные через более длинный пентандиовый линкер (**5b**, **6b**), связываются с рибосомой прочнее, чем соответствующие производные с бутандиовым линкером (**5a**, **6a**), а пентапептидные аналоги (**6a**, **6b**) прочнее, чем трипептидные (**5a**, **5b**). Возможно, это объясняется тем, что более длинный линкер обеспечивает бóльшую подвижность хлорамфеникольного и пептидного фрагментов в рибосомном туннеле, в то время как второй остаток аргинина в пентапептиде – дополнительные взаимодействия с нуклеотидами PT. Соединение **7**, содержащее «перевернутый» пептидный фрагмент, показало наибольшую аффинность к бактериальным рибосомам среди содержащих остатки онкоцина аналогов хлорамфеникола, в несколько раз превышающую таковую у хлорамфеникола.

Подтвержденное экспериментально предсказанное молекулярным моделированием высокое сродство полученных пептидных аналогов хлорамфеникола к бактериальным рибосомам рационализирует необходимость проверки их ингибирующей активности в отношении пептидилтрансферазной реакции.

***In vitro* трансляция.** Измерение ингибирующей активности проводили в бесклеточной системе трансляции мРНК ферментов дигидрофолатредуктазы (*DHFR*) и люциферазы светлячка (*Fluc*). Оказалось, что, несмотря на прочное связывание с бактериальной рибосомой, большинство производных ингибирует синтез белка слабее, чем хлорамфеникол (рис. 3, *б*). В то же время RAW-CAM (**2b**) ингибирует сходным с хлорамфениколом образом, а его ацетильное производное (**2a**) уже такую активность не проявляет. Однако какая-либо зависимость уровня ингибирования трансляции от наличия *N*-концевой ацетильной группы либо от других особенностей структуры полученных соединений не наблюдается. Как не обнаруживается и корреляции между значениями констант диссоциации комплексов аналогов хлорамфеникола с рибосомой и их ингибирующей активностью (рис. 3, *б*). Небольшая, но значимая корреляция наблюдается лишь между уровнем ингибирования синтеза белка исследуемыми соединениями и их энергией взаимодействия с рибосомой, приходящейся на один тяжелый (неводородный) атом (рис. S4a в Приложении) [42].

Химический пробинг. Трипептидные аналоги хлорамфеникола со свободной *N*-концевой аминогруппой, проявившие значительную аффинность к рибосоме, были исследованы на способность непосредственного взаимодействия с нуклеотидами центральной петли домена V 23S рРНК рибосомы *E. coli*. Для этого комплексы рибосомы с аналогами хлорамфеникола, а также с эритромицином, тилозином и хлорамфениколом, взаимодействие которых с рибосомой хорошо изучено [43, 40], подвергали обработке DMS и анализировали уровень модификации соответствующих гетероциклических оснований, нормировав его на степень модификации не вовлеченных во взаимодействия с антибиотиками нуклеотидов (рис. 4, *а*, *б*). Все исследованные трипептидные аналоги в той или иной мере вызывают защиту нуклеотидов, выстилающих стенки рибосомного туннеля (A2058, A2059 и A2062), что согласуется со способностью данных производных вытеснять из него флуоресцентный аналог эритромицина BODIPY-ERY.

Уровень защит нуклеотидов РТ от модификации DMS указывает на то, что по характеру связывания RAW-CAM (**2b**) больше всего похож на немодифицированный хлорамфеникол, что вместе с высокой аффинностью к рибосоме объясняет наибольшую активность этого аналога. В отличие от соединения **2b**, другие трипептидные аналоги хлорамфеникола (**1b**, **3b**, **4b**) вызывают частичную защиту нуклеотида A2058. Связывание данных молекул, скорее всего, будет невозможным по ходу трансляции, когда в туннеле будет располагаться растущий пептид, в отличие от хлорамфеникола, который может связываться в присутствии пептидил-тРНК, вызывая тем самым арест трансляции [44].

В то же время их аффинность к соответствующему сайту связывания, по-видимому, недостаточна, чтобы конкурировать с удлиняющейся пептидной цепью в процессе элонгации, что объясняет низкую эффективность этих производных при подавлении трансляции в бесклеточной системе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что трипептидные аналоги хлорамфеникола, содержащие в структуре последовательности известных «стоп»-пептидов, способны связываться с рибосомой *E. coli* на уровне близком к исходному антибиотику [23]. Было также показано, что аминокислотные аналоги хлорамфеникола, в которых дихлорацетильный фрагмент заменен на остаток аминокислоты, способной протонироваться, также проявляют высокую аффинность к бактериальным рибосомам, связываются с рибосомой в том же сайте, что и хлорамфеникол, при этом заместитель при аминогруппе хлорамфениколамина направлен в сторону выхода из РТ. Для аминокислотных аналогов хлорамфеникола было выявлено также отсутствие корреляций между способностью к связыванию с рибосомами и их ингибирующей активностью *in vitro* [24]. Трипептидные аналоги хлорамфеникола, найденные в результате виртуального скрининга по их аффинности к бактериальной рибосоме и синтезированные в данном исследовании, все содержат в структуре а.о., способные заряжаться положительно, а также гидрофобные а.о. (рис. 2 и 3, табл. 2).

Подробный анализ результатов скрининга показал преобладание ароматических аминокислот в структурах трипептидных аналогов хлорамфеникола, обладающих наименьшей рассчитанной энергией взаимодействия с рибосомой, независимо от модели их связывания (рис. S1 в Приложении). Несмотря на то, что ранее была показана высокая аффинность гистидинового аналога хлорамфеникола к бактери-

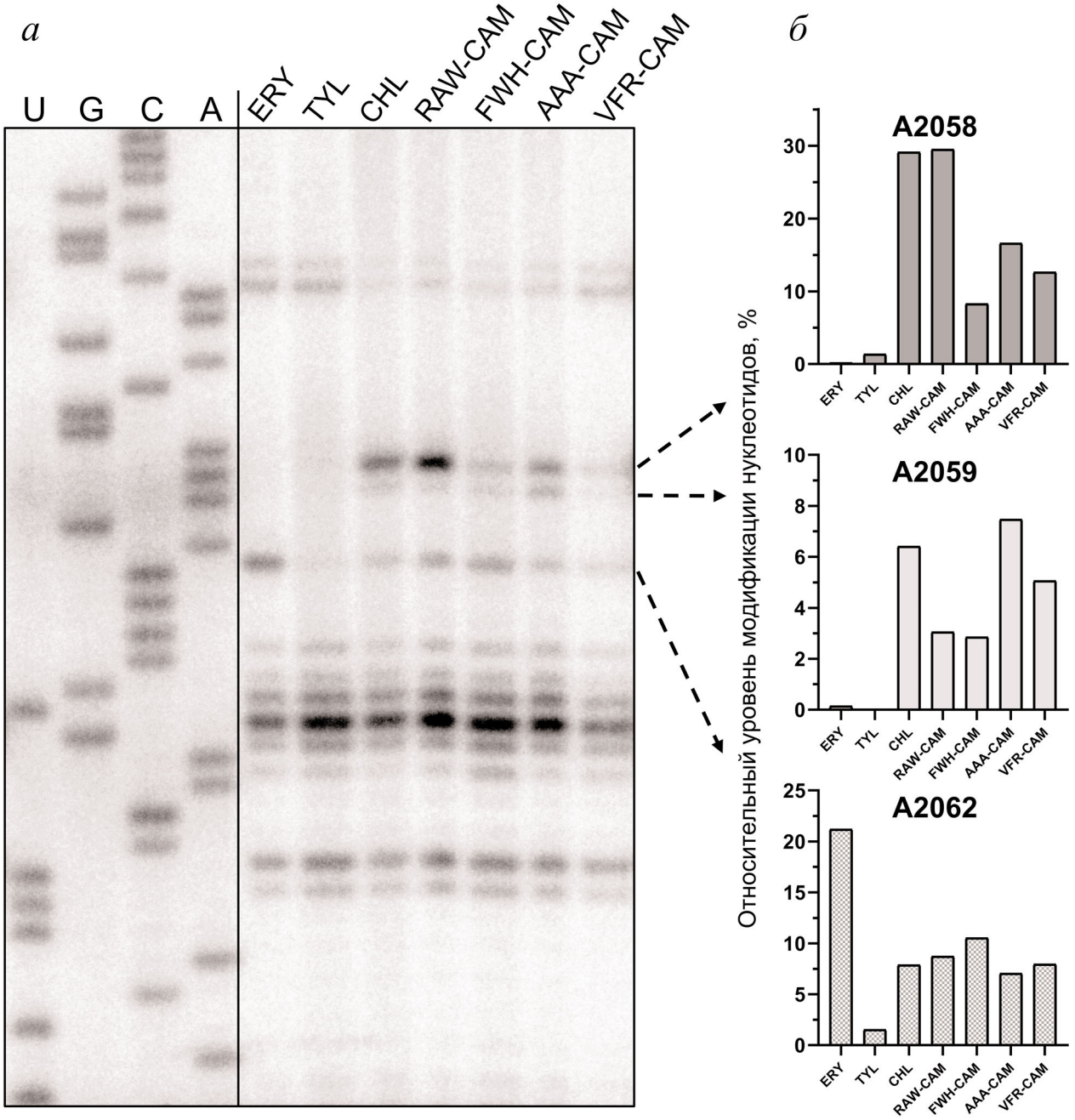


Рис. 4. Модификация нуклеотидов центральной петли домена V 23S рРНК рибосомы *E. coli* с помощью DMS в присутствии антибиотиков эритромицина (ERY), тилозина (TYL), хлорамфеникола (CHL) и трипептидных аналогов хлорамфеникола: FWH-CAM (**1b**), RAW-CAM (**2b**), VFR-CAM (**3b**), AAA-CAM (**4b**). *а* – Электрофореграмма полученных в результате обратной транскрипции 23S рРНК олигонуклеотидов. *б* – Относительный уровень модификации нуклеотидов A2058, A2059 и A2062, нормированный на степень модификации не вовлеченных во взаимодействия с антибиотиками нуклеотидов

альной рибосоме [24], производные, содержащие другие ароматические аминокислоты, не проявляли подобных свойств. Нельзя исключать, что характер связывания пептидных аналогов отличен от аминокислотных производных, однако возможным объяснением наблюдаемых результатов виртуального скрининга может также являться либо недоучет потери в конформационной энтропии лигандов при связывании, либо переоценка вклада π-π-взаимодействий в оценочной функции программного обеспечения, использующегося для молекулярного докинга. Поэтому для дальнейшего синтетического получения были выбраны трипептид-

ные аналоги, содержащие также положительно заряженные аминокислоты, конъюгаты которых с хлорамфениколамином показали ранее высокое сродство к рибосоме [24]. В целом результаты виртуального скрининга для N-ацетилтрипептидных производных хлорамфениколамина согласуются с экспериментально измеренной их аффинностью к рибосоме (табл. 1 и 2). Явный выпад энергии взаимодействия для небольшой, по сравнению с трипептидными аналогами, молекулы хлорамфеникола также может объясняться недостаточным негативным вкладом конформационной энтропии в оценочную функцию программы, что приводит к сильному завышению результатов молекулярного докинга с ростом размера молекулы. В то же время при анализе энергий взаимодействия с рибосомой, приходящихся на один тяжелый атом соединения (эффективностей лигандов) [42], рассчитанных для конформаций, среднеквадратичное отклонение хлорамфеникольной части молекулы в которых от соответствующих рентгеноструктурных данных составляет менее 3 Å, наблюдается значимая корреляция с экспериментальными данными по эффективности лигандов (рассчитанные из соответствующих K_D) для всех полученных соединений (рис. S4b в Приложении).

Результаты молекулярного докинга (рис. 5) также согласуются с данными химического пробинга трипептидных аналогов хлорамфеникола (рис. 4) – пептидная часть молекул аналогов **1b**–**4b** находится в непосредственной близости от нуклеотидов рибосомного туннеля A2058, A2059 и A2062, что приводит к их частичной защите от химической модификации. Как видно из рис. 5, *а*, характер связывания RAW-CAM (**2b**) несколько отличается от остальных соединений. Подобно хлорамфениколу [15, 38], **2b** не взаимодействует с A2058, а образуя компактную структуру, вступает в перпендикулярные π-взаимодействия с A2062 за счёт гуанидиновой группы аргинина, а также с G2505 за счёт остатка триптофана. *N*-Концевая аминогруппа данного соединения, согласно результатам молекулярного докинга, образует водородную связь с U2506. Судя по данным химического пробинга и молекулярного докинга, по механизму действия RAW-CAM наиболее близок к хлорамфениколу, что, по-видимому, и обуславливает его высокую ингибирующую активность (рис. 3, *б*).

Наличие ароматических аминокислот в структуре FWH-CAM (**1b**) приводит к их множественному π-π-взаимодействию с гетероциклическими основаниями нуклеотидов U2585, U2506, G2505, C2610 в различных ориентациях плоскостей ароматических систем (рис. 5, *б*). Кроме того, остатки фенилаланина и триптофана также образуют внутримолекулярные перпендикулярные π-π-взаимодействия. Остаток гистидина, находящийся около нуклеотидных остатков A2058 и A2059, образует водородную связь с O4′ G2505. В случае производного VFR-CAM (**3b**), кроме водородных связей с A2058, A2062 и G2505, наблюдается наличие смещенного стэкинга между гуанидиновой группой аргинина и гетероциклическим основанием A2062 (рис. 5, *г*), а также между бензольным кольцом фенилаланина и основанием C2611. Несмотря на отсутствие в структуре пептидного фрагмента соединения AAA-CAM (**4b**) боковых радикалов, содержащих полярные атомы, эта молекула образует водородные связи с нуклеотидами PT за счёт своего пептидного остова (рис. 5, *в*). Однако отсутствие какого-либо взаимодействия с A2059, а также потенциально высокая подвижность молекулы, по-видимому, приводят к слабой его защите в случае химической модификации (рис. 4) и низкой аффинности соединения к рибосоме. Защита от модификации A2062, наблюдаемая в химическом пробинге для всех соединений, видимо, в первую очередь обеспечивается пептидным остовом молекулы. Во всех соединениях атомы кислорода амидной группы пептидного фрагмента могут образовывать водородные связи с аминогруппой аденина A2062. Бóльшая аффинность пептидных аналогов со свободной концевой аминогруппой, по-видимому, обеспечивается за счёт дополнительных взаимодействий между этой группой и элементами PT. И если в случае **2b** явно наблюдается соответствующая водородная связь с U2506 (рис. 5, *а*), то в других соединениях возможно образование катион-π-взаимодействий с данным нуклеотидом. Не исключено также, что, как и в случае гистидинового аналога хлорамфеникола [24], реализуется каскад водородных связей, образованных через молекулу воды.

Среди аналогов хлорамфеникола, содержащих остатки антимикробного пептида онкоцина (**5a**, **6a**, **5b**, **6b**, **7**), пентапептидное производное, содержащее линкер на основе пентандиовой кислоты, CAM-C3-PRPRP (**6b**), и его палиндромный аналог Ac-PRPRPβA-CAM (**7**) превзошли по аффинности к рибосоме хлорамфеникол. Анализ результатов молекулярного докинга (рис. 6) показал, что структуры их комплексов с рибосомой *T. thermophilus*, в которых амфеникольная часть молекулы находится в сайте связывания хлорамфеникола, отличаются от соответствующих рентгеноструктурных данных, полученных для онкоцина [16]. Причинами этому могут быть как общие ограничения используе-

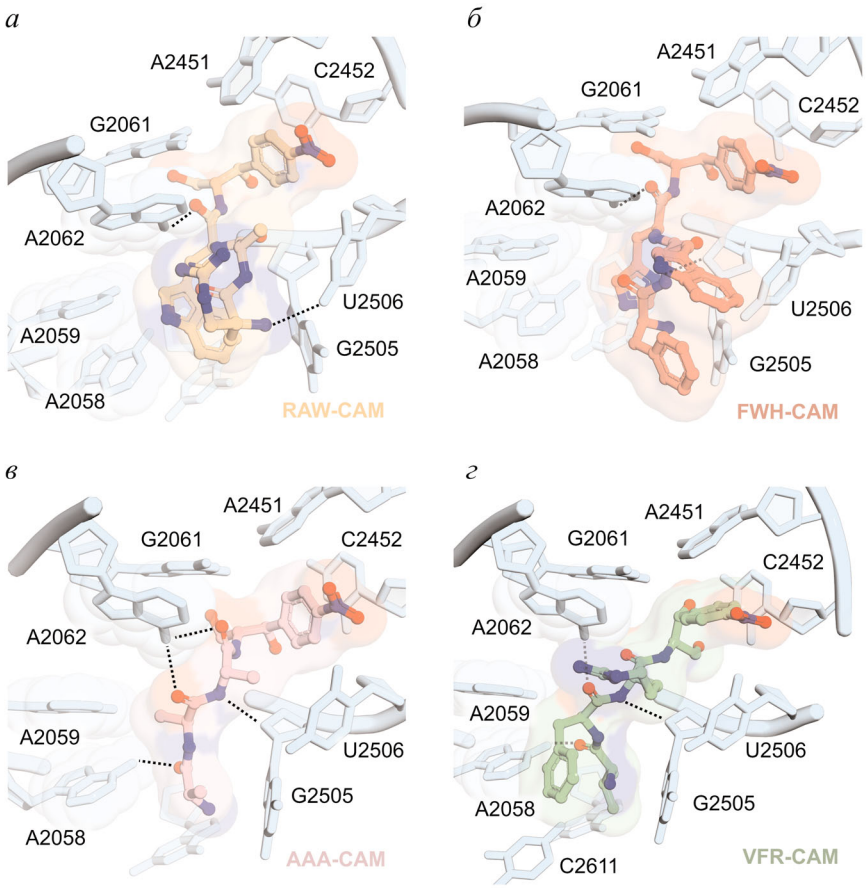


Рис. 5. Структуры комплексов трипептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомой *E. coli*, полученные методом молекулярного докинга. *а* – RAW-CAM (**2b**); *б* – FWH-CAM (**1b**); *в* – AAA-CAM (**4b**); *г* – VFR-CAM (**3b**). Пунктирной линией обозначены возможные водородные связи с нуклеотидами 23S рРНК

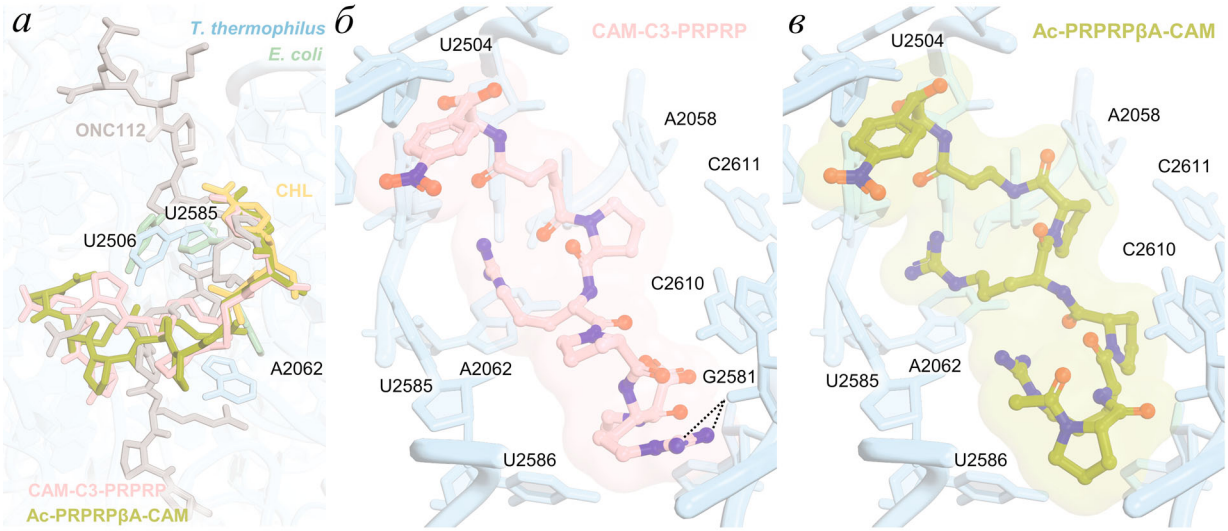


Рис. 6. Структуры комплексов пептидных аналогов хлорамфеникола, содержащих палиндромную последовательность ProArgProArgPro, встречающуюся в антимикробном пептиде онкоцине, с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C [16]), полученные методом молекулярного докинга. Структуры хлорамфеникола (*а* – желтый цвет), онкоцина112 (*а* – серый), аналога хлорамфеникола, содержащего фрагмент онкоцина $Pro^{8}Arg^{9}Pro^{10}Arg^{11}Pro^{12}$, соединенный с хлорамфениколамином через пентандиовую кислоту: CAM-C3-PRPRP (**6b**) (*а* и *б* – розовый) и аналога хлорамфеникола, содержащего «перевернутый» фрагмент онкоцина $Pro^{8}Arg^{9}Pro^{10}Arg^{11}Pro^{12}$, соединенный с хлорамфениколамином через β-аланин: Ac-PRPRPβA-CAM (**7**) (*а* и *в* – зеленый). Представлена нумерация нуклеотидов, характерная для рибосомы *E. coli*

мого метода молекулярного моделирования, так и тот факт, что нуклеотидные основания остатков A2062, U2506 и U2585 по-разному ориентированы при связывании хлорамфеникола и онкоцина.

В то же время, несмотря на противоположные направления пептидных цепей в аналогах **6b** и **7**, полученные для них конформации оказались очень схожими. В обоих соединениях остаток аргинина, соответствующий положению 9 в последовательности онкоцина, взаимодействует с A2062, однако в отличие от антимикробного пептида его боковая цепь располагается с другой стороны относительно нуклеотида. В случае производного **6b** наблюдается возможность образования водородной связи между остатком, моделирующим Arg^{11}, и O2′ G2581. Предполагаемые взаимодействия могут быть причиной высокого сродства рассматриваемых аналогов к рибосоме, но, как и в случае трипептидных аналогов, не объясняют их низкую ингибирующую активность в сравнении с хлорамфениколом.

Как следует из структур комплексов аналогов хлорамфеникола **1b–4b** (рис. 5) и **6b, 7** (рис. 6) с бактериальными рибосомами по результатам молекулярного докинга, а также, исходя из данных химического пробинга, эти соединения за счёт аминокислотных радикалов и пептидного остова способны взаимодействовать с рядом нуклеотидных остатков PT, важных для регуляции и остановки трансляции [6, 7, 11, 16, 17]. Несомненно, столь большое количество разнообразных взаимодействий аналогов с элементами PT может обеспечивать наблюдаемую высокую аффинность полученных соединений к рибосоме. Однако тот факт, что уровень ингибирования пептидилтрансферазной реакции лишь для одного из них – RAW-CAM (**2b**), достигает активности исходного антибиотика, хлорамфеникола, а также недавние исследования, показавшие возможность связывания хлорамфеникола с бактериальной рибосомой в присутствии растущей пептидной цепи [44–46], свидетельствует о необходимости уточнения механизма взаимодействия хлорамфеникола и его аналогов с функциональным комплексом рибосомы в процессе трансляции.

С другой стороны, проведение виртуального скрининга производных хлорамфениколамина, основанного на имеющихся структурных данных комплексов хлорамфеникола с рибосомой с помощью их докинга в свободную рибосому, но не ограниченного включениями в структуру пептидных фрагментов, может позволить добиться такой аффинности соответствующих аналогов, которая будет достаточна для конкуренции с растущей пептидной цепью в ходе трансляции и не будет связана с контекстной специфичностью исходного антибиотика.

Таким образом, в настоящей работе показано, что виртуальный скрининг на основе молекулярного докинга позволяет предсказать относительную аффинность пептидных аналогов хлорамфеникола к бактериальной рибосоме, так же как и рациональный дизайн на основе известных ингибиторов трансляции. Среди трипептидных аналогов хлорамфеникола катионные аналоги способны связываться с рибосомой наиболее прочно, а экспериментально полученные и рассчитанные значения эффективностей лигандов коррелируют между собой. Аналог RAW-CAM в экспериментах по ингибированию биосинтеза белка *in vitro* проявляет активность, близкую к хлорамфениколу, что подтверждается данными химического пробинга, указывающими на то, что по характеру связывания в PT этот аналог сходен с немодифицированным хлорамфениколом.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-00873-а (синтез аналогов, молекулярный докинг, связывание с рибосомами) и № 19-34-51021 (*in vitro* трансляция, пробинг)). Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Благодарности. Мы благодарим А.А. Богданова за инициирование и поддержку работ по изучению пептидных производных рибосомных антибиотиков. Авторы также благодарят А.Л. Коневегу за предоставленные для работы рибосомы и BODIPY-Met-tRNA; М.В. Серебрякову за масс-спектрометрические анализы; Ю.К. Гришина за ЯМР-спектры.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/10541), том 85, вып. 11, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, **289**, 905-920, doi: 10.1126/science.289.5481.905.
2. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, **289**, 920-930, doi: 10.1126/science.289.5481.920.
3. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a *Mesophilic Eubacterium*, *Cell*, **107**, 679-688, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00546-3.
4. Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., and Korshunova, G. A. (2010) Ribosomal tunnel and translation regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1501-1516, doi: 10.1134/S000629791013001 8.
5. Duc, K. D., Batr, S. S., Bhattacharya, N., Cate, J. H. D., and Song, Y. S. (2019) Differences in the path to exit the ribosome across the three domains of life, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4198-4210, doi: 10.1093/nar/gkz106.
6. Gupta, P., Liu, B., Klepacki, D., Gupta, V., Sschulten, K., Mankin, A., and Vázquez-Laslop, N. (2016) Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules, *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 153-158, doi: 10.1038/nchembio.1998.
7. Wilson, D. N., Arenz, S., and Beckmann, R. (2016) Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **37**, 123-133, doi: 10.1016/j.sbi.2016.01.008.
8. Gamerdinger, M., Kobayashi, K., Wallisch, A., Kreft, S. G., Sailer, C., et al. (2019) Early scanning of nascent polypeptides inside the ribosomal tunnel by NAC, *Mol. Cell*, **75**, 996-1006, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.030.
9. Hansen, J. L., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit, *J. Mol. Biol.*, **330**, 1061-1075, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00668-5.
10. LaMarre, J., Mendes, R. E., Szal, T., Schwarz, S., Jones, R. N., and Mankin, A. S. (2013) The genetic environment of the *cfr* gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 1173-1179, doi: 10.1128/AAC.02047-12.
11. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., and Mankin, A. S. (2010) The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide, *EMBO J.*, **29**, 3108-3117, doi: 10.1038/emboj.2010.180.
12. Polikanov, Y. S., Aleksashin, N. A., Beckert, B., and Wilson, D. N. (2018) The mechanisms of action of ribosome-targeting peptide antibiotics, *Front. Mol. Biosci.*, **5**, 48, doi: 10.3389/fmolb.2018.00048.
13. Arenz, S., Meydan, S., Starosta, A. L., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., and Wilson, D. N. (2014) Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation, *Mol. Cell*, **56**, 446-452, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.014.
14. Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., and Wilson, D. N. (2014) Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide, *Nat. Commun.*, **5**, 3501-3516, doi: 10.1038/ncomms4501.
15. Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., and Cate, J. H. D. (2010) Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17152-17157, doi: 10.1073/pnas.1007988107.
16. Roy, R. N., Lomakin, I. B., Gagnon, M. G., and Steitz, T. A. (2015) The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 466-469, doi: 10.1038/nsmb.3031.
17. Seefeldt, A. C., Nguyen, F., Antunes, S., Pérébaskine, N., Graf, M., et al. (2015) The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 470-475, doi: 10.1038/nsmb.3034.
18. Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., et al. (2017) An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 752-757, doi: 10.1038/nsmb.3439.
19. Pérébaskine, N., Gambato, S., Mardirossian, M., Hofmann, S., Müller, C., et al. (2018) The dolphin proline-rich antimicrobial peptide Tur1a inhibits protein synthesis by targeting the bacterial ribosome, *Cell Chem. Biol.*, **25**, 530-539, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.004.
20. Gagnon, M. G., Roy, R. N., Lomakin, I. B., Florin, T., Mankin, A. S., and Steitz, T. A. (2016) Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 2439-2450, doi: 10.1093/nar/gkw018.
21. Kumar, P., Kizhakkedathu, J., and Straus, S. (2018) Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*, *Biomolecules*, **8**, 4-27, doi: 10.3390/biom8010004.
22. Mamos, P., Krokidis, M. G., Papadas, A., Karahalios, P., Starosta, A. L., Wilson, D. N., Kalpaxis, D. L., and Dinos, G. P. (2013) On the use of the antibiotic chloramphenicol to target polypeptide chain mimics to the ribosomal exit tunnel, *Biochimie*, **95**, 1765-1772, doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.004.
23. Tereshchenkov, A. G., Shishkina, A. V., Tashlitsky, V. N., Korshunova, G. A., Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V. (2016) Interaction of chloramphenicol tripeptide analogues with the ribosome, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 392-400, doi: 10.1134/S000629791604009X.
24. Tereshchenkov, A. G., Dobosz-Bartoszek, M., Osterman, I. A., Marks, J., Sergeeva, V. A., et al. (2018) Binding action of amino-acid analogues of chloramphenicol upon the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **430**, 842-852, doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.016.
25. Graf, M., Mardirossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A. C., Guichard, G., Scocchi, M., Innis, C. A., Wilson, D. N. (2017) Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis, *Nat. Prod. Rep.*, **34**, 702-711, doi: 10.1039/C7NP00020K.
26. Knappe, D., Ruden, S., Langanke, S., Tikkoo, T., Ritzer, J., Mikut, R., Martin, L. L., Hoffmann, R., and Hilpert, K. (2016) Optimization of oncocin for antibacterial activity using a SPOT synthesis approach: extending the pathogen spectrum to *Staphylococcus aureus, Amino Acids*, **48**, 269-280, doi: 10.1007/s00726-015-2082-2.
27. Li, J., Kim, I. H., Roche, E. D., Beeman, D., Lynch, A. S., Ding, C. Z., and Ma, Z. (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of BODIPY®–erythromycin probes for bacterial ribosomes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 794-797, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.11.028.
28. Ji, J., Chakraborty, A., Geng, M., Zhang, X., Amini, A., Bina, M., and Regnier, F. (2000) Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides, *J. Chromatogr. B*, **745**, 197-210, doi: 10.1016/s0378-4347(00)00192-4.
29. O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., and Hutchison, G. R. (2011) Open babel: an open chemical toolbox, *J. Cheminformatics*, **3**, 33, doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
30. Stewart, J. J. P. (2012) Optimization of parameters for semi-empirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, *J. Mol. Model.*, **19**, 1-32, doi: 10.1007/s00894-012-1667-x.

31. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
32. Alhossary, A., Handoko, S. D., Mu, Y., and Kwoh, C.-K. (2015) Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2, *Bioinformatics*, **31**, 2214-2216, doi: 10.1093/bioinformatics/btv082.
33. Rebstock, M. C., Crooks, H. M., Controulis, J., and Bartz, Q. R. (1949) Chloramphenicol (chloromycetin). IV. Chemical studies, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2458-2462, doi: 10.1021/ja01175a065.
34. Yan, K., Hunt, E., Berge, J., May, E., Copeland, R. A., and Gontarek, R. R. (2005) Fluorescence polarization method to characterize macrolide-ribosome interactions, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3367-3372, doi: 10.1128/AAC.49.8.3367-3372.2005.
35. Wang, Z. X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule, *FEBS Lett.*, **360**, 111-114, doi: 10.1016/0014-5793(95)00062-e.
36. Moazed, D., and Noller, H. F. (1989) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites, *Cell*, **57**, 585-597, doi: 10.1016/0092-8674(89)90128-1.
37. Moazed, D., and Noller, H. F. (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome, *Nature*, **342**, 142-148, doi: 10.1038/342142a0.
38. Svetlov, M. S., Plessa, E., Chen, C.-W., Bougas, A., Krokidis, M. G., Dinos, G. P., and Polikanov, Y. S. (2019) High-resolution crystal structures of ribosome-bound chloramphenicol and erythromycin provide the ultimate basis for their competition, *RNA*, **25**, 600-606, doi: 10.1261/rna.069260.118.
39. Ashwood, M. S., Bishop, C. B., Cottrell, I. F., Emerson, K. M., Hands, D., Ho, G. J., Lynch, J. E., Shi, Y. J., and Wilson, R. D. (2003) Process for preparing peptide intermediates, *European Patent Office*, EP1226158A1.
40. Kostopoulou, O., Kourelis, T., Mamos, P., Magoulas, G., and Kalpaxis, D. (2011) Insights into the chloramphenicol inhibition effect on peptidyl transferase activity, using two new analogs of the drug, *Open Enzym. Inhib. J.*, **411**, 1-10, doi: 10.2174/1874940201104010001.
41. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Barlos, K., and Grell, E. (1994) A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotrityl chloride resin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **22**, 2559-2560, doi: 10.1039/C39940002559.
42. Kuntz, I. D., Chen, K., Sharp, K. A., and Kollman, P. A. (1999) The maximal affinity of ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9997-10002, doi: 10.1073/pnas.96.18.9997.
43. Poulsen, S. M., Kofoed, C., and Vester, B. (2000) Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin, *J. Mol. Biol.*, **304**, 471-481, doi: 10.1006/jmbi.2000.4229.
44. Choi, J., Marks, J., Zhang, J., Chen, D. H., Wang, J., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., and Puglisi, J. D. (2019) Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 310-317, doi: 10.1038/s41589-019-0423-2.
45. Marks, J., Kannan, K., Roncase, E. J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2016) Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12150-12155, doi: 10.1073/pnas.1613055113.
46. Makarov, G. I., and Makarova, T. M. (2018) A noncanonical binding site of chloramphenicol revealed via molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 2940-2947, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.09.012.

INTERACTION OF CHLORAMPHENICOL CATIONIC PEPTIDE ANALOGUES WITH THE RIBOSOME

Z. Z. Khairullina[1#], A. G. Tereshchenkov[2#], S. A. Zavyalova[3], E. S. Komarova[4,5], D. A. Lukianov[5], V. N. Tashlitsky[1], I. A. Osterman[1,5], and N. V. Sumbatyan[1*]

[1] *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: sumbtyan@belozersky.msu.ru*

[2] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

[3] *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

[4] *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

[5] *Skolkovo Institute of Science and Technology, 143025 Moscow, Russia*

Received July 13, 2020
Revised September 7, 2020
Accepted September 9, 2020

Virtual screening of all possible tripeptide analogues of chloramphenicol was performed using molecular docking to evaluate their affinity to bacterial ribosomes. Chloramphenicol analogues that demonstrated the lowest calculated energy of interaction with ribosomes were synthesized. Chloramphenicol amine (CAM) derivatives, which contained specific peptide fragments from the proline-rich antimicrobial peptides were produced. It was demonstrated using displacement of the fluorescent erythromycin analogue from its complex with ribosomes that the novel peptide analogues of chloramphenicol were able to bind bacterial ribosome; all the designed tripeptide analogues and one of the chloramphenicol amine derivatives containing fragment of the proline-rich antimicrobial peptides exhibited significantly greater affinity to *Escherichia coli* ribosome than chloramphenicol. Correlation between the calculated and experimentally evaluated levels of the ligand efficiencies was observed. *In vitro* protein biosynthesis inhibition assay revealed, that the RAW-CAM analogue shows activity at the level of chloramphenicol. These data were confirmed by the chemical probing assay, according to which binding pattern of this analogue in the nascent peptide exit tunnel was similar to chloramphenicol.

Keywords: ribosome, chloramphenicol, peptide derivatives, molecular docking, antimicrobial peptides, nascent peptide exit tunnel

БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 11, с. 1718 – 1728

УДК 577.217.347;57.052.2;544.165;51-76

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА 2,8-ДИМЕТИЛИРОВАНИЯ A2503 23S рРНК *E. coli* МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2020 Т.М. Макарова*, Г.И. Макаров

Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), 454080 Челябинск, Россия; электронная почта: makarovatm@susu.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020
После доработки 01.10.2020
Принята к публикации 02.10.2020

Рибосома – это молекулярная машина, синтезирующая все клеточные белки. Она также является мишенью около половины клинически используемых антибиотиков. Один из способов защиты от антибиотиков заключается в адаптивной химической модификации остатков рибосомальных РНК. Любопытным примером такой модификации служит 2,8-диметилирование A2503 23S рРНК, вызывающее устойчивость к фениколам, линкозамидам, оксазолидинонам, плевромутилинам и некоторым макролидам. В настоящей работе методом молекулярно-динамического моделирования исследовалось, как 2,8-диметилирование A2503 влияет на конформации и подвижность нуклеотидных остатков 70S рибосом *Escherichia coli*. Значительные изменения были выявлены как в непосредственном окружении остатка A2503 23S рРНК, так и глубже в рибосомном туннеле (РТ) среди остатков, о которых известно, что они вовлечены в процесс передачи сигнала от антибиотиков, связывающихся в РТ, к пептидилтрансферазному центру. Эти изменения смещают рибосому в сторону состояния A/A,P/P из конформационно иного состояния, в нашем примере – это состояние P/P,E/E. Это позволяет заключить, что эффект модификации m^2m^8A2503 состоит в дополнительной стабилизации состояния A/A,P/P, способствующего пептидилтрансферазной реакции (ПТР) в противоположность действию антибиотиков – ингибиторов ПТР.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, устойчивость, антибиотики, A2503, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0320972520110135

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – это крупный рибонуклеопротеидный комплекс, который синтезирует все клеточные белки по программе, доставляемой матричной РНК. Будучи одним из ключевых элементов живой клетки, эта древняя молекулярная машина содержит универсально консервативные структурные элементы, построенные из рибосомной РНК (рРНК), которые в природных условиях сравнительно редко подвергаются мутациям [1]. Это обстоятельство, наряду с присутствием множества копий рибосомальной РНК в геномах живых организмов, сделало рибосому удобной мишенью для разнообразных антибиотиков [2]. Примерно половина антибиотиков, используемых сегодня в клинической практике, являются ингибиторами синтеза белка на рибосоме. Тем не менее число патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, связывающимся с рибосомой, растёт с каждым годом [2, 3].

Один из механизмов устойчивости бактериальной рибосомы к действующим на неё антибиотикам состоит в химической модификации остатков рРНК, локализованных преимущественно в функциональных центрах рибосомы [4], и эти модификации, как правило, заключаются в дополнительном неконституитивном метилировании того или иного остатка рРНК [5]. Пример этого – метилирование остатка A2503 (здесь и ниже используется нумерация, принятая для рРНК *Escherichia coli*) 23S рРНК большой субъединицы бактериальной рибосомы по положению C8, осуществляемое метилтрансферазой Cfr [6], впервые обнаруженной в *Staphylococcus sciuri* [7], относящейся к семейству так называемых радикальных SAM-метилтрансфераз (SAM – S-аденозил-L-метионин) [8]. В рибосоме бактерий дикого типа остаток A2503 подвержен конституитивному метилированию по положению C2, осуществляемому метилтрансферазой RlmN; совместное действие этих метил-

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; ПТР – пептидилтрансферазная реакция; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; РТ – рибосомный туннель; рРНК – рибосомная РНК; RMSD – среднеквадратическое отклонение от заданной структуры.

* Адресат для корреспонденции.

трансфераз приводит к диметилированию A2503 и превращению его в m^2m^8A2503.

Дополнительная химическая модификация приводит к устойчивости бактерий к антибиотикам разных семейств (фениколам, линкозамидам, оксазолидинонам, плевромутилинам и стрептограминам A), связывающимся с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ) рибосомы и примыкающей к нему верхней части рибосомного туннеля (РТ). Данный тип устойчивости именуется $PhLOPS_a$ резистентностью по первым буквам названий перечисленных семейств. Появление у рибосомы столь ярко выраженной множественной лекарственной устойчивости, как правило, объясняют тем, что дополнительная метильная группа в m^2m^8A2503 создаёт прямые стерические затруднения для связывания того или иного антибиотика со своим сайтом [10]. Впрочем, необходимо заметить, что пространственная структура рибосомы с диметилированным остатком A2053 неизвестна, а детальный структурный анализ комплексов модифицированной таким образом рибосомы с антибиотиками до сих пор не проводился.

Консервативный нуклеотидный остаток m^2A2503 соединяет два одноцепочечных тяжа рРНК, формирующих так называемые стенки туннеля. При этом остаток m^2A2503 вклинивается в цепочку нуклеотидов между A2059, с одной стороны, и G2061 – с другой, в то время как A2060 выпетливается из стопки. Эта цепочка из остатков 2058–2062 23S рРНК, как считается, образует путь передачи сигналов из внешних сайтов РТ в ПТЦ [11–13].

Для изучения воздействия диметилирования A2503 на структуру рибосомы мы задействовали метод моделирования молекулярной динамики (МД), успешно применяемый для описания динамических аспектов структуры и функционирования рибосомы [13]. Было исследовано влияние 8-метилирования m^2A2503 как на A/A,P/P-состояние рибосомы, предшествующее пептидилтрансферазной реакции (ПТР), так и на состояние P/P,E/E, по ряду сведений, аллостерически антагонистическое первому состоянию [14, 15].

В настоящей работе были смоделированы комплексы целой 70S рибосомы *E. coli* в обоих функциональных состояниях с двумя вариантами профиля метилирования остатка A2503 для дальнейшего использования в расчётах МД. Было изучено влияние модификации резистентности на конформацию и нековалентные связи остатков рРНК, и наибольшие конформационные изменения были обнаружены у достаточно удаленных от A2503 остатков U2609 и U1782, а также расположенного еще глубже по рибосомному туннелю A751. Все эти остатки, согласно экспериментальным данным, участвуют в ряде случаев передачи сигнала из РТ в ПТЦ при остановке трансляции антибиотиками и так называемыми стоп-пептидами (stalling peptides), и они связаны с m^2m^8A2503 через сеть нековалентных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделируемая система. Исходным конструктом для моделируемых систем была выбрана структура рибосомы *E. coli*, полученная методом криоэлектронной микроскопии с разрешением от 2,9 Å (код PDB: 5AFI) [10]. В эту структуру комплекса рибосомы с деацилированной E–тРНК^{fMet}, fMet–P–tRNA^{fMet} и Phe–A/T–тРНК^{Phe} в составе тройного комплекса с EF-Tu, GTP и кирромицином добавили недостающие модифицированные основания в соответствии со сведениями из банка данных [16].

Ранее нами уже был описан протокол получения из структуры 5AFI комплексов рибосомы, стабильно и воспроизводимо связывающих тРНК как в A/A- и P/P-сайтах, так и в P/P- и E/E-сайтах [17]. Упомянем лишь, что этот протокол содержит минимум три коротких расчета МД с поэтапным снятием позиционных ограничений с различных частей системы. Системы с m^2m^8A2503 были сделаны на их основе, и расчёту МД предшествовала минимизация энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно с ограниченным использованием памяти [18].

Условия моделирования. Все расчёты МД и анализ полученных траекторий проводили с использованием пакета GROMACS [19, 20] версии 5.1.4 и силового поля AMBER-14SB [21].

Топологии, оптимизация геометрии и молекулярных электростатических потенциалов неканонических остатков РНК и остатков аминокислот, связанных с 3′-концом тРНК, были получены с помощью квантово-химических расчётов. Предварительная оптимизация вновь параметризуемых остатков осуществлялась с помощью программы ПРИРОДА [22, 23] методом DFT с функционалом mPBE [24] и базисным набором L1 [25]. Оптимизация завершалась по выполнению 300 шагов или достижению градиентом значения ниже 10^{-6} Хартри/Бор. Окончательная оптимизация геометрии остатка и расчёт его электростатического потенциала выполнялся в пакете FIREFLY [26, 27] методом Хартри–Фока с базисом 6–31G*. Оптимизация также прекращалась по выполнению 300 шагов или

достижению градиентом значения ниже 10^{-6} Хартри/Бор.

Все моделирования МД выполнялись при температуре 310 K (температурном оптимуме *E. coli*) с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [28] и периодическими граничными условиями с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [29] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [30] с шагом сетки 0,125 нм и четвертым порядком интерполяции. Моделируемая система была центрирована в орторомбической ячейке с рёбрами 24 × 27 × 25 нм, заполненной молекулами воды $TIP4P_{ew}$ так, что оконечности рибосомы от границ ячейки отделял слой растворителя минимум 1,5 нм. Отрицательный заряд системы был нейтрализован ионами калия с оптимизированными Ван-дер-Ваальсовыми параметрами [31] вкупе с видимыми с помощью криоэлектронной микроскопии структурными ионами магния. Нейтрализованная система содержала 100 мМ KCl и 6 мМ $MgCl_2$ в виде ионов.

Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 15 пс.

Методы анализа траекторий. Анализ нековалетных взаимодействий и конформаций остатков РНК осуществлялся для отрезков траекторий после 100 нс расчётов, когда среднеквадратическое отклонение от заданной структуры (RMSD) и потенциальная энергия стабилизировались.

Водородные связи анализировались с помощью встроенных возможностей GROMACS: в каждом кадре траектории наличие или отсутствие конкретной связи определялось геометрическими параметрами:

- атом-донор водорода и атом-акцептор разделены расстоянием не более 3,5 Å;
- угол водород-донор-акцептор меньше 30°.

Также геометрические параметры были введены для распознавания стэкинг-взаимодействий азотистых оснований остатков РНК, для чего вычислялся центр азотистого основания (среднее арифметическое координат атомов C2, C4 и C6 для пиримидинов и N1, N3 и C8 для пуринов) и уравнение плоскости по трём этим точкам. Стэкинг-взаимодействие в кадре записывалось, если:

- расстояние между центрами не превышало 5,5 Å;
- угол между плоскостями азотистых оснований не превышал 30°;
- угол между плоскостью первого азотистого основания и отрезком, соединяющим геометрические центры, составлял как минимум 45°; без этого условия компланарная пара оснований (например, уотсон-криковская) была бы ошибочно распознана как пара стэкинг-взаимодействия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дополнительная метильная группа приводила к усилению стэкинг-взаимодействий m^2m^8A2503 с соседними основаниями. Остаток m^2A2503 23S рРНК, располагаясь на тяже между спиральными структурами H89 и H90, вклинивается в стопку стэкинг-взаимодействий аналогичного одноцепочечного тяжа между H73 и H74 с образованием неспаренной стопки C2063–G2061–m^2A2503–A2059–A2058. При этом A2060 из основного тяжа тоже выпетливается и образует третичные стэкинг-взаимодействия с G2502 – основание-сосед исследуемого m^2A2503.

Мы воспользовались ранее полученными системами и траекториями [17] следующих типов, чтобы внедрить в них модификацию m^2m^8A2503 и изучить её конформационное воздействие на своё окружение, каждая из которых в дальнейшем будет упоминаться в виде аббревиатуры. Эти аббревиатуры обозначают следующее:

- PE – комплекс рибосомы с fMet–P–тРНК^{fMet} и деацилированной E–тРНК^{fMet};
- AP – комплекс рибосомы с Ala–A–тРНК^{Phe} и fMet–P–тРНК^{fMet}.

Получение исходных AP- и PE-систем подробно описано в нашей предыдущей работе [17]. Тогда из этих систем было получено по 4 траектории длиной 200 нс для каждого функционального состояния рибосомы. После добавления метильной группы в остаток m^2A2503 23S рРНК по 8-му положению мы удостоверились, что система быстро достигает стабильного состояния: рост RMSD прекращается до 60–80 нс (рис. 1), а колебания потенциальной энергии практически сразу исчерпывают какое-либо направленное движение (рис. 2).

Поэтому, как и в предыдущих расчётах систем AP и PE с обычным m^2A2503, для анализа были взяты последние 100 нс каждой из траекторий. Встречаемости водородных связей и стэкинг-взаимодействий азотистых оснований остатков рРНК во вновь полученных траекториях, как и для канонических AP- и PE-состояний рибосом, были рассчитаны по последним 100 нс с вычислением среднего значения и стандартного отклонения по 4 значениям для каждого типа системы.

Наиболее непосредственным эффектом модификации оказалось усиление способности к стэкинг-взаимодействию основания m^2m^8A2503 со своими соседями – G2061 и A2059 (рис. 3). Это небольшое изменение в конформациях и силе взаимодействий приводит к разрушению стэкинг-взаимодействия соседнего остатка G2502 с A2060, из-за чего последний образует такое взаимодействие преимущественно с U1255 (таблица).

Кроме того, стабилизация положения остатка A2503 23S рРНК и перераспределение электронной плотности в нем способствуют значительному увеличению встречаемости водородной связи его с аденином остатка A2062, совершенно исключая встраивание A2062 между G2061 и C2063, как это происходит во многих кадрах траекторий рибосомы в состоянии AP.

И все же перечисленные изменения касаются только непосредственных соседей остатка A2503 и не распространяются ниже в PT или выше до ПТЦ. Таким образом, модификация m^2m^8A2503 не вызывает существенных возмущений AP-состояния рибосомы помимо непосредственной окрестности диметилированного остатка.

Удаленные конформационные изменения в PT и других сайтах рибосомы, индуцированные введением m^2m^8A2503. Итак, дополнительное неконститутивное метилирование остатка A2503 23S рРНК приводит к перераспределению связей в области третичных контактов двух одноцепочечных участков близ ПТЦ. Это воздействие, как выяснилось, может передаваться глубже в PT – туда, где вновь синтезированная пептидная цепь должна взаимодействовать с рибосомой.

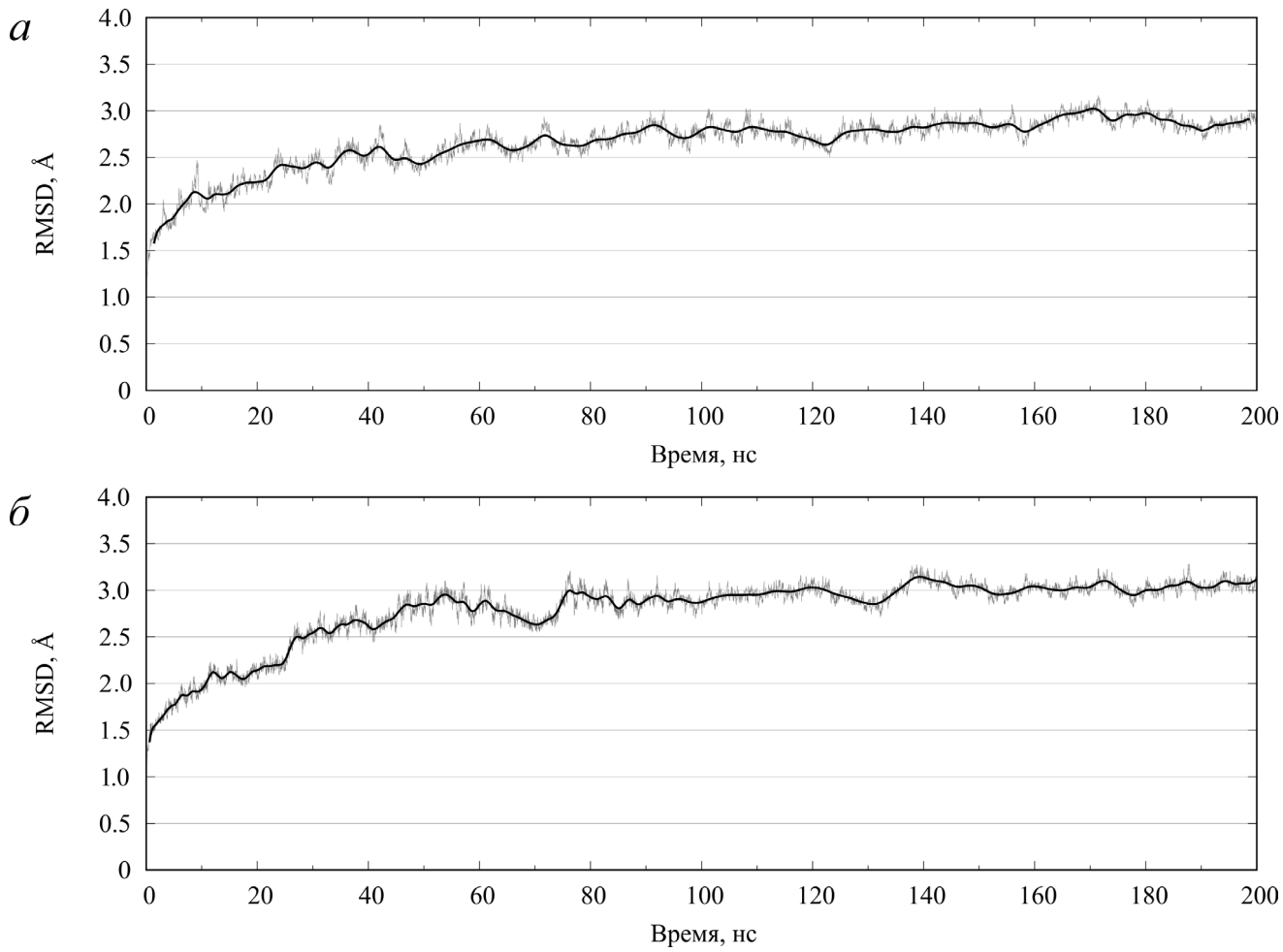


Рис. 1. Изменение RMSD рибосомы при расчёте МД после добавления модифицированного остатка m^2m^8A2503: показано на примере одной из 4-х траекторий длиной 200 нс для каждого типа системы. Непосредственные значения показаны бледно-серым цветом на фоне скользящего среднего по 100 точкам, начерченного сплошной черной линией, сглаженной методом кривых Безье. *а* – AP-состояние. *б* – PE-состояние

Связи, стабильно и воспроизводимо изменяющиеся в основном кластере 23S рРНК при добавлении 8-метильной группы к m^2A2503

Взаимодействие	AP дикий тип	AP m^2m^8A2503	PE дикий тип	PE m^2m^8A2503
G2061‖m^2A2503	33,8 ± 25,4	38,0 ± 33,5	15,4 ± 17,4	84,6 ± 3,8
A2062/N^6–H...m^2A2503/N^7	8,3 ± 9,6	55,8 ± 40,5	37,3 ± 36,1	12,4 ± 24,9
Основные изменения в AP-состоянии				
A2060‖G2502	33,0 ± 23,0	7,3 ± 14,4	26,9 ± 33,9	0,1 ± 0,2
U1255‖A2060	34,5 ± 30,8	55,4±19,5	23,1±28,1	21,6 ± 32,6
G830/N^1–H...A2448/N^7	44,6 ± 12,0	0,1 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0
C961‖A2031	0,2 ± 0,3	38,8 ± 19,7	72,7 ± 2,2	61,1 ± 15,4
C2499/N^4–H...G2454/O^6	6,1 ± 7,1	70,5 ± 45,7	13,8 ± 11,4	22,0 ± 20,6
G2454/N^2–H...C2499/O^2	3,5 ± 7,1	67,6 ± 41,7	0 ± 0	0 ± 0
G2454/N^1–H...C2499/N^3	3,4 ± 6,7	68,9 ± 45,1	0 ± 0	0 ± 0
A2453/N^6–H...U2500/O^4	7,0 ± 14,1	89,8 ± 5,0	0 ± 0	1,9 ± 3,2
U2500/N^3–H...A2453/N^1	8,0 ± 15,9	62,6 ± 37,4	0 ± 0	12,5 ± 17,5
G2454‖G2455	90,4 ± 11,9	19,2 ± 35,9	93,4 ± 2,6	89,1 ± 4,0
Ψ2504/N^1–H...G2447/O^6	14,8 ± 12,4	61,9 ± 31,4	0 ± 0	0 ± 0
Cm2498/N^4–H...C2499/N^3	0 ± 0	20,6 ± 3,6	0,8 ± 1,6	0 ± 0
Cm2498‖C2499	37,4 ± 11,8	72,5 ± 19,5	84,5 ± 12,4	78,8 ± 23,4
A945/N^6–H...A2448/N^3	25,7 ± 13,5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
U2500‖Ψ2504	13,3 ± 7,9	66,2 ± 22,6	1,4 ± 2,8	10,0 ± 18,0
G830‖A945	70,0 ± 7,8	20,1 ± 34,8	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,3
G2446/N^2–H...D2449/O^2	12,6 ± 4,0	41,5 ± 23,8	84,5 ± 6,4	61,6 ± 42,6
C2452/N^4–H...Ψ2504/O^2	3,8 ± 7,5	56,1 ± 26,4	25,6 ± 48,2	48,2 ± 40,5
Изменения в PE-состоянии в PT				
A1783/N^6–H...A2587/$O_{2'}$	7,4 ± 14,8	5,1 ± 10,2	23,1 ± 32,2	68,0 ± 6,0
U1779/N^3–H...G2588/$O_{2'}$	13,0 ± 13,1	9,7 ± 9,8	64,1 ± 42,9	0,5 ± 0,6
A1785/N^6–H...U1779/O^4	0 ± 0	0 ± 0	81,3 ± 9,0	20,1 ± 22,1
A783/$O^{2'}$–H...U1779/O^2	39,8 ± 27,0	32,2 ± 22,2	62,0 ± 41,5	0,1 ± 0,1
A751‖A789	0 ± 0	0,1 ± 0,3	33,0 ± 29,5	0 ± 0,1
U1782‖U2609	94,8 ± 4,5	92,1 ± 9,0	84,4 ± 13,7	40,1 ± 30,0
A781/$O^{2'}$–H...C1788/O^2	3,3 ± 4,0	2,8 ± 2,6	1,1 ± 2,2	23,0 ± 17,1

Окончание таблицы

Взаимодействие	AP дикий тип	AP m^2m^8A2503	PE дикий тип	PE m^2m^8A2503
Изменения в PE-состоянии в окрестности E-сайта				
U2075/N^3–H...A2435/N^1	1,5 ± 3,0	0 ± 0	6,1 ± 5,6	52,5 ± 29,5
U2074/N^3–H...G2597/N^3	0 ± 0	0 ± 0	38,3 ± 11,2	61,4 ± 5,7
U200/N^3–H...G248/$O_{4'}$	8,3 ± 16,6	6,9 ± 10,2	69,0 ± 8,5	44,1 ± 9,9
U2076‖U2596	79,3 ± 13,7	66,5 ± 19,7	60,7 ± 7,5	32,1 ± 4,6
A197/N^6–H...A2430/$O_{2'}$	57,9 ± 8,0	64,0 ± 19,1	52,8 ± 35,4	4,1 ± 4,3
U2431/$O_{2'}$–H...A2433/N^7	0 ± 0	0 ± 0	54,4 ± 20,9	8,1 ± 13,0
G2436/N^2–H...U2074/O^4	0 ± 0	0 ± 0	6,5 ± 7,8	48,7 ± 23,3
U2075/N^3–H...A2077/N^7	88,1 ± 12,2	95,2 ± 2,2	58,3 ± 9,1	21,5 ± 22,1
A2077/N^6–H...U2075/O^4	31,7 ± 47,0	0,1 ± 0,1	98,5 ± 0,4	54,0 ± 41,4
A2435/N^6–H...U2075/O^4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	38,6 ± 35,8

Примечание: AP и PE обозначают рибосому с A/A–тРНК и P/P–тРНК либо P/P–тРНК и E/E–тРНК соответственно. Значения рассчитаны по 4-м независимым траекториям каждой из систем и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Троеточие обозначает водородную связь, двойная вертикальная черта ‖ – стэкинг-взаимодействие.

Наиболее явные изменения были найдены в PE-состоянии рибосомы.

Последовательность азотистых оснований C2063–G2061–m^2A2503–A2059–A2058, образующих стэкинг-взаимодействия, переходит в спираль H73, начинающуюся с пар G2057–C2611 и G2057–C2612. Они ковалентно связаны с важными аллостерическими сенсорами в PT, C2610 и U2609 [32]. В AP-состоянии остатки PT сохраняют свою конформацию при любой степени модификации A2503, однако в PE-состоянии взаимодействие остатков U2609 и U1782 расходится, и последний занимает положение, близкое к таковому в AP-состоянии (рис. 4).

Разворот U1782 передается на U1781 и связанный с ним в стэкинг-взаимодействии A752. Это смещает A751 в положение, воспроизводящее AP-состояние (рис. 5), как это уже было отмечено с U1782, из-за чего полностью разрушается стэкинг-взаимодействие A751 и A789, что аналогично воспроизводит AP-состояние (таблица). Таким образом, только в PE-состоянии, функционально противоположном AP-состоянию, наблюдаются конформационные изменения в области PT, воспроизводящие последнее из аллостерически антагонистичных состояний. Это может означать локальную гиперстабилизацию AP-состояния посредством данной мутации резистентности.

Кроме того, остатки U2609 и U1782 и область A751 участвуют в передаче аллостерического сигнала из PT в ПТЦ и A-сайт, что является ключевым механизмом воздействия антибиотиков, связывающихся в рибосомном туннеле [32].

Что же касается остальной рибосомы, то изменения в PT в целом не вызывали масштабных глобальных переконфигураций нековалентных связей в рРНК как, например, в случае мутаций, явно нарушавших её функционирование [17]. Стабильных и воспроизводимых изменений во встречаемости нековалентных взаимодействий РНК как минимум на 20% было суммарно обнаружено в 253 случаях для AP-состояния и в 296 случаях для PE-состояния (при наличии примерно 22 тыс. связей, воспроизводимых хотя бы в одном из состояний). Изменяющиеся связи были распределены по всей рибосоме, и в обоих случаях можно было выделить как минимум 2 крупных кластера, внутри которых остатки рРНК, образовавшие такую связь, отделены друг от друга не более чем тремя остатками, соединёнными стабильной связью. Первый кластер содержал участки 23S и 5S рРНК центральной области большой субъединицы рибосомы, вто-

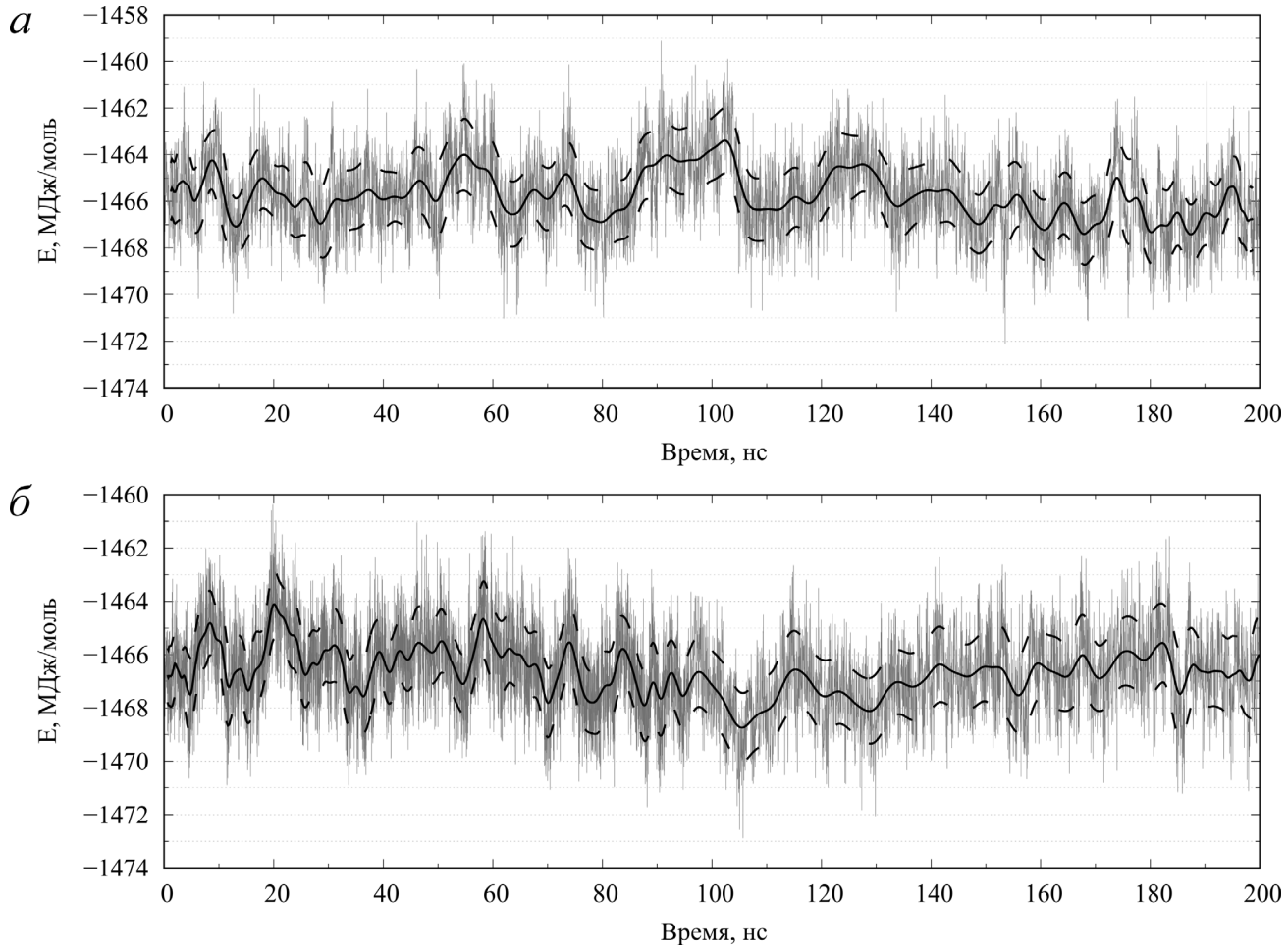


Рис. 2. Эволюция потенциальной энергии рибосомы во времени при расчёте МД после добавления модифицированного остатка m^2m^8A2503: показано на примере одной из 4-х траекторий длиной 200 нс для каждого типа системы. Непосредственные значения показаны бледно-серым цветом на фоне скользящего среднего по 100 точкам, начерченного сплошной черной линией, сглаженной методом кривых Безье, диапазон значений в пределах скользящего стандартного отклонения ограничен пунктирными линиями. *а* – AP-состояние. *б* – PE-состояние

рой – фрагменты малой субъединицы и некоторых межсубъединичных мостов.

В самом крупном таком кластере остатков рРНК наибольшее число изменений AP-состояния модификацией m^2A2503 было обнаружено вокруг ПТЦ в спиралях H89 и H74, а также области их стыка, и, кроме того, около области соединения спиралей H37 и H39. Обнаруженные изменения касались главным образом стабилизации внутренних связей спиралей и межспиральных элементов (таблица, раздел «Основные изменения в AP-состоянии»).

В противоположность этому, в PE-состоянии перераспределения связей концентрируются вокруг универсально консервативного сочленения спиралей H74, H75 и H93 (таблица, раздел «Основные изменения в PE-состоянии»), которое непосредственно примыкает к сайту связывания остатка C75 E–тРНК – предположительным аллостерически чувствительным сайтом, связанным с E–тРНК [17]. Шпилька H93 из упомянутого сочленения спиралей наиболее непосредственно связывает E-сайт и начало PT. Возможно, изменения на одном из её концов также влияют на разворот стопки из двух оснований, U2609 и U1782, в положение, которое близко к таковому в AP-состоянии.

Количественные данные встречаемостей обсуждаемых выше связей указаны в таблице.

Согласно данным молекулярно-динамического моделирования систем рибосомы с конститутивным и неконститутивным метилированием остатка A2503 23S рРНК, дополнительное

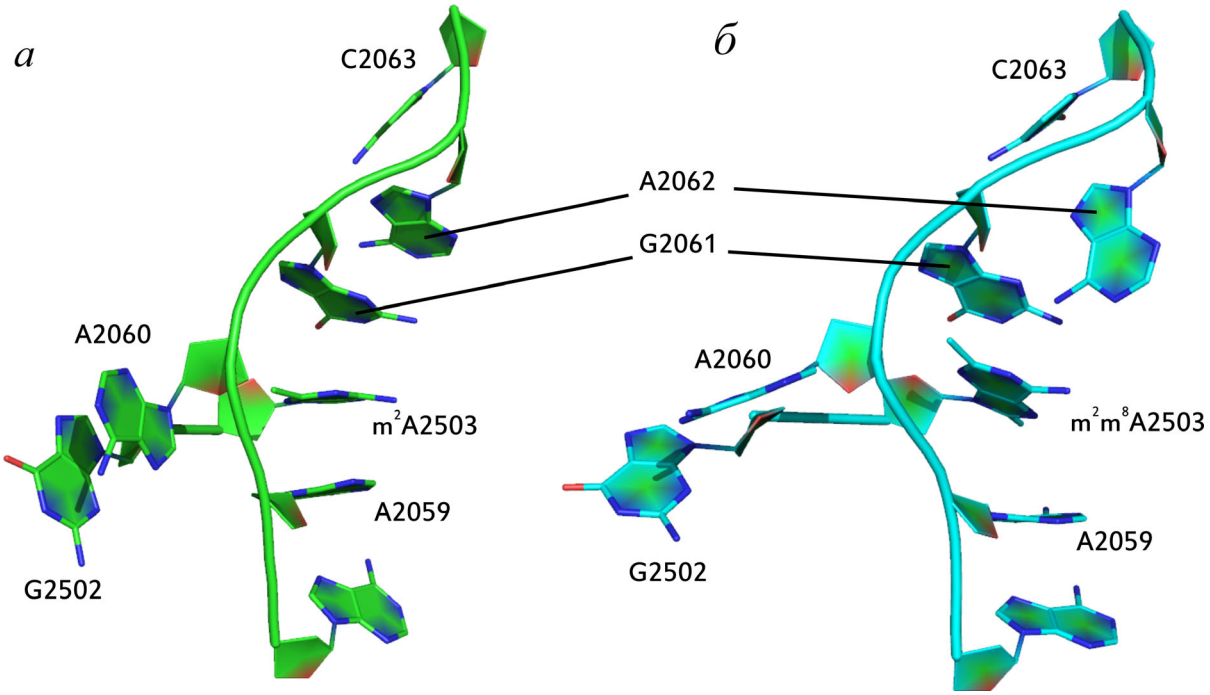


Рис. 3. Сравнение характерной конформации ближайшего окружения остатка 2503 23S рРНК при различных модификациях последнего. Дополнительное 8-метилирование остатка m^2A2503 усиливает стэкинг-взаимодействия этого остатка, но вызывает разрушение аналогичного взаимодействия G2502 с A2060. Показан кадр траектории, наиболее близкий к центроиду основного кластера изображенных остатков рРНК в 4-х конечных 100 нс участках из 200 нс для каждой системы. *а* – AP-состояние рибосомы дикого типа (с m^2A2503). *б* – AP-состояние рибосомы с m^2m^8A2503. (С цветными вариантами рис. 3–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

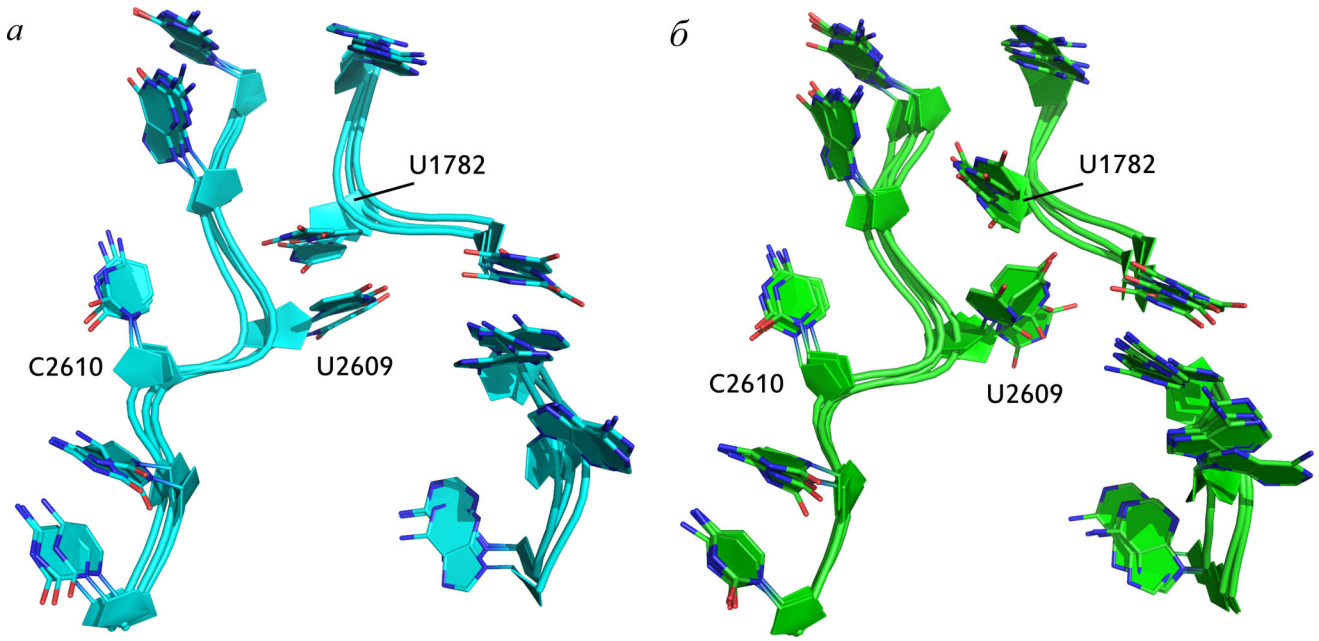


Рис. 4. Разрушение стэкинг-взаимодействия между остатками U2609 и U1782 23S рРНК в траекториях с 2,8-диметилированным A2503. На рисунке изображены наиболее заселенные кластеры остатков PT: 3 кластера рибосомы дикого типа, которые суммарно занимают 82,1% всех кадров из 4-х траекторий и 4 кластера рибосомы с m^2m^8A2503, которые охватывают 83,5% кадров соответственно. *а* – PE-состояние рибосомы дикого типа (с m^2A2503). *б* – PE-состояние рибосомы с m^2m^8A2503

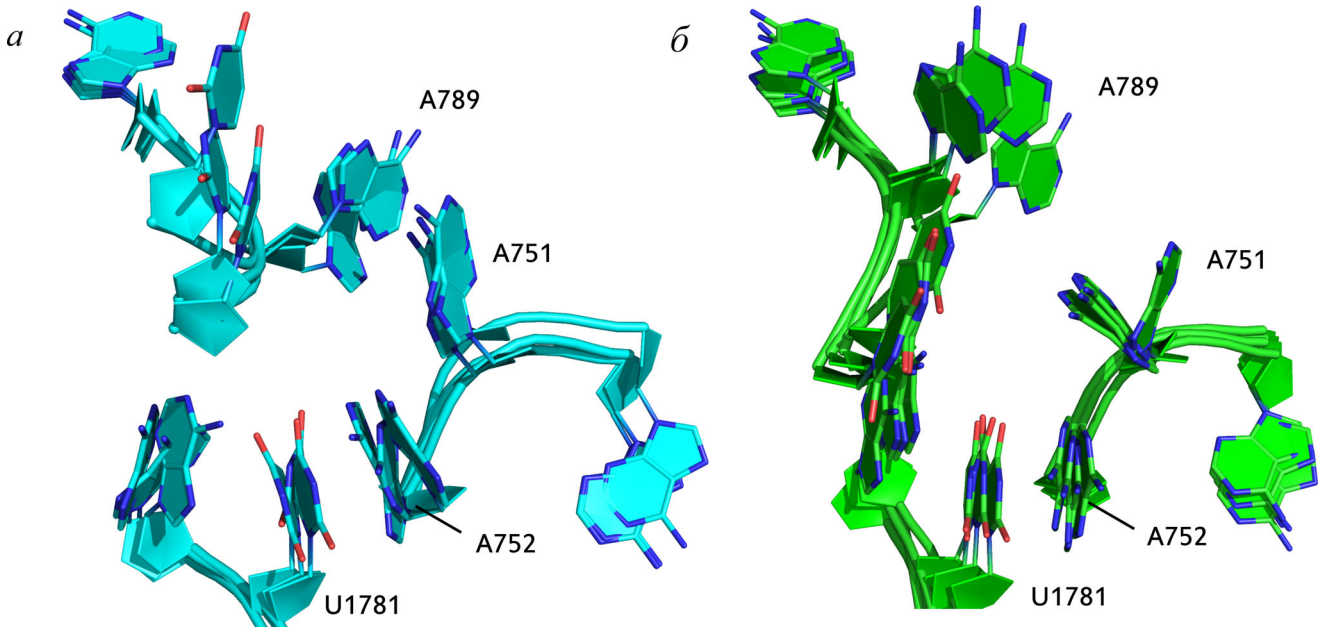


Рис. 5. Разрушение стэкинг-взаимодействия между остатками A751 и A789 23S рРНК в траекториях с 2,8-диметилированным A2503. На рисунке изображены наиболее заселенные кластеры остатков РТ: 3 кластера рибосомы дикого типа, которые суммарно занимают 82,1% всех кадров из 4-х траекторий и 4 кластера рибосомы с m^2m^8A2503, которые охватывают 83,5% кадров соответственно. *а* – PE-состояние рибосомы дикого типа (с m^2A2503). *б* – PE-состояние рибосомы с m^2m^8A2503

8-метилирование усиливает стэкинг-взаимодействия азотистого основания A2503. Это изменение подтягивает остатки G2061 и A2059 к A2503. В результате в AP-состоянии рибосомы, предшествующем ПТР, обнаружилось лишь несколько значительных конформационных изменений и перегруппировок в непосредственном сайте модификации. Напротив, в присутствии тРНК в E-сайте конформационные перегруппировки состоялись как в самом E-сайте, так и в РТ с участием остатков, известных как важные участники аллостерического взаимодействия РТ и ПТЦ.

Таким образом, модификация m^2m^8A2503 не нарушает AP-состояния рибосомы, необходимого для протекания ПТР, но смещает антагонистичное ему состояние обратно в сторону AP-подобной конформации некоторых остатков. Отсюда следует, что объяснение широкому спектру антибиотиков с разнообразными сайтами связывания, от которых данная модификация защищает бактерии, может быть найдено в дополнительной стабилизации предшествующего ПТР состояния рибосомы. Этот факт следует принимать во внимание при дальнейшем изучении данной модификации резистентности с антибиотиками и их стоп-пептидами.

Финансирование. Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-00022) и Правительства Российской Федерации (резолюция № 1 от 16.03.2013, контракт № 02.A03.21.0011).

Благодарность. Авторы выражают глубокую благодарность академику РАН Богданову Алексею Алексеевичу за инициирование молекулярно-динамического исследования модификаций резистентности в рибосоме. Авторы благодарят Вычислительный центр МГУ имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность вести расчеты МД на суперкомпьютере «Ломоносов–II».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. Данная статья не содержит каких-либо исследований, содержащих эксперименты на людях или животных, проводимых кем-либо из авторов статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yonath, A. (2009) Ribosome: an ancient cellular nanomachine for genetic code translation, in *Biophysics and the challenges of emerging threats* (Puglisi, J. D., ed.) Springer, Netherlands, pp. 121-155, doi: 10.1007/978-90-481-2368-1_8.
2. Манькин А. (2001) Рибосомные антибиотики, *Молекулярная биология*, **35**, 597-609, doi: 10.1023/A:1010510623805.
3. McCusker, K. P., and Fujimori, D. G. (2012) The chemistry of peptidyltransferase center-targeted antibiotics: enzymatic resistance and approaches to countering resistance, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 64-72, doi: 10.1021/cb200418f.
4. Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
5. Vester, B., and Long, K. S. (2009) Antibiotic resistance in bacteria caused by modified nucleosides in 23S ribosomal RNA, in *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution* (Grosjean, H. ed.) Landes Bioscience, Austin, USA.
6. Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., Hansen, L. H., Gondela, A., Long, K., Vester, B., and Kirpekar, F. (2009) Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria, *RNA*, **15**, 327-336, doi: 10.1261/rna.1371409.
7. Schwarz, S., Werckenthin, C., and Kehrenberg, C. (2000) Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2530-2533, doi: 10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000.
8. Yan, F., LaMarre, J. M., Rohrich, R., Wiesner, J., Jomaa, H., Mankin, A. S., and Fujimori, D. G. (2010) RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3953-3964, doi: 10.1021/ja910850y.
9. Smith, L. K., and Mankin, A. S. (2008) Transcriptional and translational control of the *mir* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1703-1712, doi: 10.1128/AAC.01583-07.
10. Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., and Stark, H. (2015) Structure of the *E. coli* ribosome–EF–Tu complex at < 3 Å resolution by Cs–corrected cryo–EM, *Nature*, **520**, 567-570, doi: 10.1038/nature14275.
11. Makarov, G., Golovin, A., Sumbatyan, N., and Bogdanov, A. (2015) Molecular dynamics investigation of a mechanism of allosteric signal transmission in ribosomes, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1047-1056, doi: 10.1134/S0006297915080106.
12. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., and Mankin, A. S. (2010) The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide, *EMBO J.*, **29**, 3108-3117, doi: 10.1038/emboj.2010.180.
13. Sanbonmatsu, K. (2012) Computational studies of molecular machines: the ribosome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 168-174, doi: 10.1016/j.sbi.2012.01.008.
14. Gnirke, A., Geigenmuller, U., Rheinberger, H. J., and Nierhaus, K. H. (1989) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. analysis with a heteropolymeric mRNA, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7291-7301.
15. Chen, C., Stevens, B., Kaur, J., Smilansky, Z., Cooperma, B. S., and Goldman, Y. E. (2011) Allosteric vs. spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early in protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16980-16985, doi: 10.1073/pnas.1106999108.
16. Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., et al. (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs, *BMC Bioinform.*, **3**, 1-31, doi: 10.1186/1471-2105-3-2.
17. Makarova, T., and Bogdanov, A. (2019) Allosteric regulation of the ribosomal A site revealed by molecular dynamics simulations, *Biochimie*, **167**, 179-186, doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.019.
18. Byrd, R., Lu, P., and Nocedal, J. (1995) A limited memory algorithm for bound constrained optimization, *SIAM J. Sci. Comput.*, **16**, 1190-1208.
19. Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. (2005) Gromacs: fast, flexible, free, *J. Comput. Chem.,* **26**, 1701-1718, doi: 10.1002/jcc.20291.
20. Hess, B., and Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) Gromacs 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435-447, doi: 10.1021/ct700301q.
21. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696-3713, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
22. Лайков Д. Н., Устынюк Ю. А. (2005) Система квантово-химических программ «ПРИРОДА-04». Новые возможности исследования молекулярных систем с применением параллельных вычислений, *Известия Академии наук. Серия химическая*, **3**, 804-810.
23. Laikov, D. N. (2011) A new parametrizable model of molecular electronic structure, *J. Chem. Phys.*, **135**, 134120, doi: 10.1063/1.3646498.
24. Adamo, C., and Barone, V. (2002) Physically motivated density functionals with improved performances: the modified perdew–burke–ernzerhof model, *J. Chem. Phys.*, **116**, 5933-5940, doi: 10.1063/1.1458927.
25. Laikov, D. N. (2005) A new class of atomic basis functions for accurate electronic structure calculations of molecules, *Chem. Phys. Lett.*, **416**, 116-120, doi: 10.1016/j.cplett.2005.09.046.
26. Schmidt, M. W., Baldridge, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., et al. (1993) General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.*, **14**, 1347-1363, doi: 10.1002/jcc.540141112.
27. URL: http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html.
28. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **126**, 014101, doi: 10.1063/1.2408420.
29. Berendsen, H., Postma, J., van Gunsteren, W., DiNola, A., and Haak, J. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684-3690, doi: 10.1063/1.448118.
30. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an *nlog*(*n*) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089, doi: 10.1063/1.464397.
31. Joung, I. S., and Cheatham, T. E. (2008) Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 9020-9041, doi: 10.1021/jp8001614.
32. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., and Mankin, A. (2011) Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics, in *Ribosomes: Structure, Function, and Dynamics*, (Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., Green, R., eds), published by Springer-Verlag, Wien, pp. 377-392.

INVESTIGATION OF ALLOSTERIC EFFECT OF 2,8-DIMETHYLATION OF A2503 23S rRNA IN *E. coli* BY MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATION

T. M. Makarova* and G. I. Makarov

South Ural State University, 454080 Chelyabinsk, Russia; E-mail: makarovatm@susu.ru

Received June 16, 2020
Revised October 1, 2020
Accepted October 2, 2020

Ribosome is a molecular machine that synthesizes all cellular proteins. It also is a target of about half of the clinically used antibiotics. Adaptive chemical modification of ribosomal RNAs residues is one of the ways to provide resistance to certain antibiotics. A curious example of such modification is 2,8-dimethylation of A2503 in 23S rRNA, which induces resistance to phenols, linkosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and certain macrolides. In this article the effect of 2,8-dimethylation of A2503 on conformation and mobility of RNA residues of the 70S *E. coli* ribosome was investigated employing molecular dynamics simulations method. Significant alterations were detected both in the immediate environment of the 2503 23S rRNA residue and in the nucleotides located deeper in the nascent peptide exit tunnel (NPET), which are known to be involved in signal transmission from the antibiotics bound in the NPET to the peptidyl transferase center. These alterations shift the ribosome towards the A/A, P/P-state from the conformationally different state – P/P, E/E one in our case. The obtained results allow us to conclude that the effect of m^2m^8A2503 modification involves additional stabilization of the A/A, P/P-state favoring the peptidyl transferase reaction (PTR) contrary to antibiotics that inhibit PTR.

Keywords: ribosome, resistance, antibiotics, A2503, molecular dynamics