

УДК 577.181

## ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СКРИНИНГА НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

П.В. Сергиев, И.А. Остерман, А.Я. Головина, Е.С. Андреевна, И.Г. Лаптев,  
Ф.И. Плетнев, С.А. Евфратов, Е.И. Марусич\*, М.С. Веселов\*, С.В. Леонов\*,  
Я.А. Иваненков\*, А.А. Богданов, О.А. Донцова

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;  
e-mail: petya@genebee.msu.ru)

Поиск новых антибиотиков является важной задачей, интересной для фундаментальной науки и практического здравоохранения. Особенно важно уже на этапе скрининга антимикробной активности получать сведения о механизме действия антибактериального вещества и при этом иметь возможность тестировать тысячи соединений. Описывается созданная на химическом факультете МГУ система роботизированного скрининга потенциальных антибиотиков, позволяющая сразу выделять те из них, которые ингибируют биосинтез белка.

**Ключевые слова:** антибиотик, синтез белка, бактерия, репортерный штамм, скрининг.

Одним из важнейших факторов увеличения продолжительности жизни человека в XX в. стало открытие антибиотиков как природного, так и синтетического происхождения. После первых успехов открытие антибиотиков стало лавинообразным, и могло показаться, что ужасы пандемий бактериальных инфекций навсегда остались в прошлом. К сожалению, достаточно быстро появились и стали молниеносно распространяться устойчивые к антибиотикам изоляты патогенных бактерий [1, 2]. В то же время начало неуклонно сокращаться количество новых антибиотиков, введенных в клиническую практику [3]. На сегодняшний день остро стоит проблема поиска новых антибиотиков, особенно принципиально новых каркасов (скэффолдов) органических соединений с антимикробной активностью, которые можно было бы усовершенствовать путем синтеза различных химических производных.

Для введения антибиотика в практику необходимо знать мишень его действия [4]. При этом, если речь идет о принципиально новом классе соединений, механизм их действия приходится изучать «с чистого листа». Это долгий и трудоемкий процесс. Среди мишеней антибиотиков особое место занимает рибосома – сложный рибонуклеопротеидный комплекс, функция которого заключается в биосинтезе белков. Предположительно рибосома является мишенью почти половины известных и используемых антибиотиков.

Ранее на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова был создан [5] и успешно апробирован [6] штамм-репортер, начинающий экспрессировать ген флюоресцентного белка CER при действии сублетальных концентраций антибиотиков, останавливающих продвижение транслирующей рибосомы по мРНК. Насущной потребностью стало создание автоматизированной системы использования данного штамма-репортера для высокопроизводительного скрининга больших библиотек соединений, потенциальных ингибиторов биосинтеза белка. В данном сообщении описано создание высокопроизводительной системы скрининга на его основе.

Цель работы – создание системы скрининга химических соединений, способной выявлять сразу и антибактериальную активность, и те соединения, которые ингибируют именно биосинтез белка. Для этого мы использовали штамм *Escherichia coli*, трансформированный плазмидой, в которой закодированы два флюоресцентных белка с хорошо различимыми спектральными характеристиками (RFP и CER). Максимумы спектров поглощения и испускания этих белков 531/595 нм (RFP) и 430/486 нм (CER). Ген RFP не регулируется и используется в качестве контрольного, а перед геном CER расположен генетически модифицированный аттенуаторный участок триптофанового оперона *E. coli*. Бактерия использует аттенуатор в качестве сенсора эффективности трансляции лидерного

\*Московский физико-технический институт (государственный университет).

пептида, содержащего два триптофановых кодона подряд. При недостатке триптофана рибосома замедляется, и вторичная структура синтезируемой РНК делает возможной транскрипцию генов биосинтеза триптофана, расположенных в геноме следом за аттенуаторной областью. В репортерной конструкции триптофановые кодоны заменены на эффективно прочитываемые аланиновые. Только остановка рибосомы антибиотиками может способствовать прохождению РНК полимеразы через аттенуаторную область, за которой в нашей конструкции располагается ген CER. Таким образом, вокруг зоны ингибирования, возникшей под действием антибактериального препарата, в том месте, где концентрация антибиотика сублетальна, происходит индукция гена CER. Экспрессия этого гена хорошо заметна визуально по образованию вокруг зоны ингибирования кольца, флюоресцирующего зеленым на фоне газона клеток репортерного штамма, флюоресцирующих красным за счет постоянной экспрессии RFP.

Для создания системы высокопроизводительного скрининга использовали роботизированную станцию «Janus» («Perkin-Elmer»), находящуюся в ЦКП МГУ. Эта станция оснащена головкой, способной пипетировать одновременно 96 соединений. В наших исследованиях управление станцией осуществлялось программой, написанной на интерпретаторе языка программирования станции MultiPROBE II WinPREP Protocol Script.

Для применения 96-канальной пипетирующей головки использование обыкновенных чашек Петри было недостаточным, поскольку не позволяло роботизированной станции наносить на них одновременно 96 соединений. Для ускорения процесса было решено использовать крупные квадратные чашки с ребром 12,5 см.

Для скрининга готовили квадратные чашки с агаром, на которые наносили газон клеток репортерного штамма, а затем одновременно 96 тестируемых соединений. Одиночную колонию клеток *E. coli* [7], трансформированную pRFP-CER-TrpL2Ala плазмидой [5], переносили в 50 мл питательной среды с ампициллином и инкубировали при температуре 37°C при перемешивании (100 об/мин) в течение 16 ч. К полученной суспензии клеток добавляли 50 мл 50%-го стерильного (автоклавированного) раствора глицерина, разделяли на аликвоты по 1 мл, замораживали и хранили при -20°C.

При приготовлении плашек взвешивали 12,5 г сухой смеси для приготовления среды *Luria-Bertani* и 7,5 г бактоагара, а затем все растворяли в объеме 0,5 л. Стерилизовали (автоклавировали)

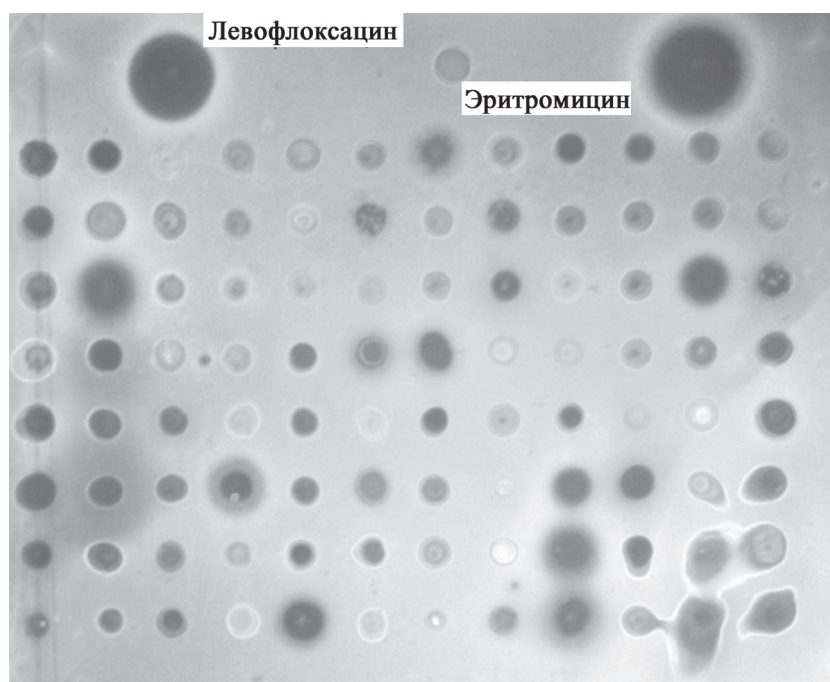
в колбе объемом 1 л в течение 45 мин при 121°C и давлении 0,5 атм. После остывания до 50°C добавляли к 0,5 л среды 500 мкл 1000-кратного раствора ампициллина, выливали на стерильные квадратные чашки Петри (125×125 мм) по 50 мл. Для приготовления положительного и отрицательного контрольных образцов, т.е. антибиотика, ингибирующего биосинтез белка, и антибиотика, имеющего другую мишень, растворяли в воде эритромицин (1 мг/мл) и левофлоксацин (30 мкг/мл).

Перед запуском программы должна быть установлена следующая конфигурация роботизированной системы:

- 1) 96-луночная плашка с тестируемыми образцами в позиции A4 левого рабочего поля станции;
- 2) плашка с ДМСО в позиции A1 правого рабочего поля станции;
- 3) чашка Петри с газонем клеток репортерного штамма в позиции D4 левого рабочего поля станции;
- 4) 96-канальная головка для носиков объемом 235 мкл в позиции A7 правого рабочего поля станции;
- 5) 96-канальная головка для носиков объемом 50 мкл в позиции D7 правого рабочего поля станции;
- 6) штатив с носиками на 235 мкл в позиции F7 правого рабочего поля станции;
- 7) штатив с носиками на 50 мкл в позиции F4 правого рабочего поля станции.

Программа управляет следующими действиями роботизированной системы:

- 1) загрузка на MDT-устройство 96-канальной головки «I200-96»;
- 2) надевание 96 носиков «P235»;
- 3) отбор 200 мкл ДМСО из ванночки «DMSO»;
- 4) добавление 200 мкл ДМСО к плашке с тестируемыми образцами;
- 5) сброс 96 носиков «P235»;
- 6) разгрузка MDT-устройства;
- 7) загрузка на MDT-устройство 96-канальной головки «I50»;
- 8) надевание 96 носиков «P50»;
- 9) перемешивание десять раз образцов (объемом 50 мкл) в плашке;
- 10) отбор 1,5 мкл образцов;
- 11) перенос образцов на чашку Петри с газонем клеток репортерного штамма;
- 12) сброс 96 носиков «P50»;
- 13) разгрузка MDT-устройства;
- 14) запрос пользователя о необходимости отбора следующих 96 образцов, в случае положительного ответа вернуться к пункту 1, в случае отрицательного – завершить работу программы.



Пример чашки с агаром, на которую нанесен репортерный штамм и тестируемые соединения. Положительный (эритромицин) и отрицательный (левофлоксацин) контрольные образцы отмечены

Созданная программа успешно протестирована на модельном наборе 10 000 органических соединений, предоставленных ЗАО «ИИХР», положительных и отрицательных контрольных образцах (эритромицин и левофлоксацин). Как и предполагалось, эритромицин, вызывающий ингибирование трансляции, индуцировал экспрессию *SER* в зоне сублетальных концентраций, а левофлоксацин, хорошо ингибирующий рост бактерий, не вызывал индукцию репортерного гена (рисунок).

В ходе тестирования показана принципиальная возможность проводить высокопроизводительный скрининг, используя чашки с агаром, на которых нанесен репортерный штамм. При этом, в отличие от многочисленных существующих систем скрининга, не приходится пипетировать никакие тестовые реакции в планшетах, что значительно убыстряет и удешевляет анализ больших библиотек химических соединений. Стоимость

экспериментальной точки скрининга получается равной чуть более стоимости одного пластикового наконечника, т.е. около 10 рублей. Для сравнения: стоимость одной экспериментальной точки скрининга с использованием системы люцифераз светлячка и коралла, также имеющей внутренний контроль, превышает 150 рублей. Кроме того, нанесение тестируемых реагентов на поверхность агара, а не в реакционную смесь, которую необходимо смешивать отдельно, значительно ускоряет процесс скрининга. Тестирование набора 10 000 соединений заняло две недели.

Таким образом, созданная система может быть пригодна для высокопроизводительного скрининга антимикробных препаратов, потенциальных ингибиторов биосинтеза белка. Предполагаемая максимально возможная производительность может составить до 250 тыс. соединений в год.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.607.21.0086, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0086) и ЗАО «ИИХР».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fowler T., Walker D., Davies S.C. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2014. Vol. 1323. P. 1.
2. Andersson D.I., Hughes D. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. Vol. 12. P. 465.
3. Overbye K.M., Barrett J.F. // *Drug. Discov. Today.* 2005. Vol. 10. P. 45.
4. Editorial // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16. P. 347.
5. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova Y.V., Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. Vol. 56. P. 1774.

6. 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., et al. // Mol. Cell. 2014. Vol. 56. P. 531.
7. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // Mol. Syst. Biol. 2006. Vol. 2. P. 2006.

Поступила в редакцию 26.08.15

## HIGH THROUGHPUT SCREENING PLATFORM FOR NEW INHIBITORS OF PROTEIN SYNTHESIS

P.V. Sergiev, I.A. Osterman, A.Ya. Golovina, E.S. Andreyanova, I.G. Laptev, P.I. Pletnev, S.A. Evfratov, E.I. Marusich, M.S. Veselov, S.V. Leonov, Ya.A. Ivanenkov, A.A. Bogdanov, O.A. Dontsova

(Department of Chemistry Lomonosov Moscow State University)

**Screening for new antibiotics is needed both for fundamental science and medical applications. It is essential to reveal antimicrobial agent mechanism of action at an early stage of high throughput screening of antimicrobial activity. A system for robotic screening of potential antibiotics was created on the Department of Chemistry of Moscow State University. The system is capable to reveal compounds that affect protein biosynthesis.**

**Key words:** antibiotic, protein synthesis, bacteria, reporter strain, screening.

**Сведения об авторах:** *Сергиев Петр Владимирович* – доцент химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, начальник центра коллективного пользования Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, докт. хим. наук (petya@genebee.msu.ru); *Илья Андреевич Остерман* – науч. сотр. кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, канд. хим. наук (osterman@yandex.ru); *Головина Анна Янковна* – науч. сотр. Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, канд. хим. наук (malanka@yandex.ru); *Андреянова Екатерина Сергеевна* – аспирант факультета биоинформатики и биоинженерии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (ekaandreyanova@yandex.ru); *Лаптев Иван Георгиевич* – науч. сотр. кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (whiteswan92@gmail.com); *Плетнев Филипп Игоревич* – науч. сотр. кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (philipppletnev@gmail.com); *Евфратов Сергей Александрович* – науч. сотр. кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (evfratov@gmail.com); *Марусич Елена Ивановна* – науч. сотр. Московского физико-технического института, канд. хим. наук (mei@pharmcluster.ru); *Вeselov Марк Сергеевич* – науч. сотр. Московского физико-технического института (veselovmark@gmail.com); *Леонов Сергей Викторович* – науч. сотр. Московского физико-технического института, канд. биол. наук (sl@pharmcluster.ru); *Иваненков Ян Андреевич* – науч. сотр. Московского физико-технического института, канд. биол. наук (yai@pharmcluster.ru); *Богданов Алексей Алексеевич* – профессор химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, акад. РАН, докт. хим. наук (bogdanov@genebee.msu.ru); *Донцова Ольга Анатольевна* – профессор химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (olga.a.dontsova@gmail.com).