

УДК 577.181

Высокопроизводительный скрининг природного биоразнообразия с целью поиска новых антибиотиков

С. С. Терехов^{1*}, И. А. Остерман^{2,3}, И. В. Смирнов^{1,2,4}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40³Сколковский институт науки и технологий, 143025, Московская обл., Сколково⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, ул. Мясницкая, 40

*E-mail: sterekhoff@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2018

Принята к печати 22.08.2018

РЕФЕРАТ Рост числа случаев инфицирования антибиотикорезистентными штаммами патогенов бросает вызов современным технологиям поиска новых лекарственных препаратов. Подходы комбинаторной химии, основанные на использовании химических библиотек и направленные на создание высокоаффинных низкомолекулярных лигандов терапевтически значимых молекулярных мишеней клеток человека, успешно зарекомендовали себя в области направленного создания высокоэффективных терапевтических агентов. В то же время эти подходы зачастую сталкиваются с непреодолимыми трудностями при создании новых антибиотиков. Природные соединения, отобранные в результате эволюции по таким важным характеристикам, как широкая специфичность и эффективность, представляют собой хорошую альтернативу химическим библиотекам. Вместе с тем, неограниченное использование природных антибиотиков и их аналогов приводит к лавинообразному распространению генов устойчивости среди бактерий. Обнаружение новых природных антибиотиков, в свою очередь, чрезвычайно затрудняет проблема «переоткрытия антибиотиков», что ставит задачу поиска альтернативных высокопроизводительных платформ скрининга антибиотической активности, культивирования «некультивируемых» микроорганизмов, а также поиска новых кластеров биосинтеза антибиотиков, их активации и гетерологической экспрессии. Высокий интерес представляют микрофлюидные технологии скрининга антибиотической активности на уровне единичных клеток, которые позволяют объединить в рамках одной платформы технологии ультравысокопроизводительного скрининга, широкомасштабного секвенирования и геномного майнинга, открывая уникальные возможности для обнаружения новых антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибиотикорезистентность, высокопроизводительный скрининг, микрофлюидика, открытие антибиотиков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; ВЭЖХ-ЯМР – высокоэффективная жидкостная хроматография-спектрометрия ядерного магнитного резонанса; BioMAP – antibiotic mode of action profile (платформа для профилирования спектра активности); FACS – флуоресцентно-активированный клеточный сортинг; GFP – зеленый флуоресцентный белок; sCu5 – сульфацианин 5; NHS – N-гидроксисукцинимид; uHT – ультравысокопроизводительный.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие антибиотиков – это одно из величайших достижений 20 века, позволившее многократно увеличить выживаемость, продолжительность и качество жизни многих миллионов людей. Период с 1940

по 1960-е годы, когда было обнаружено большинство современных антибиотиков и их производных, принято называть «золотой эрой открытия антибиотиков» [1]. Столь фантастические результаты были достигнуты благодаря успешному сочетанию простой,

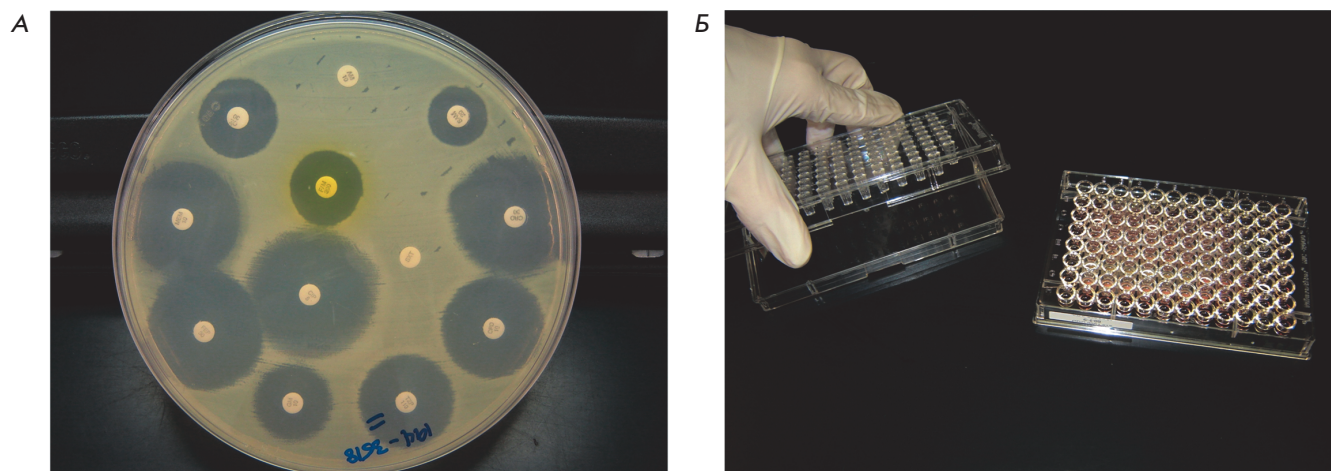


Рис. 1. Классические методы скрининга антибиотической активности: (А) поиск колоний бактерий, дающих большие зоны просветления, и (Б) последующее определение МИК (адаптировано из [4])

дешевой и в то же время эффективной платформы для скрининга и удачного выбора объекта поиска. Эта платформа, получившая впоследствии название «платформа Ваксмана» [2], заключалась в использовании чашек с агаром, на которые высевали бактерии из почвы. Бактерии-продуценты антибиотиков идентифицировали, заливая эти чашки вторым слоем агара, несущим бактерии-мишени, и выявляли клоны-кандидаты по образованию зон просветления (рис. 1), [3, 4]. Последующий отбор клонов, продуцирующих в среду антибиотики, проводили методом последовательных разведений их ростовой среды и определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Дальнейший поиск новых антибиотиков с использованием платформы Ваксмана затрудняло повторное обнаружение одних и тех же антибиотиков, поскольку данная платформа позволяла выявлять только хорошо культивируемые и быстрорастущие почвенные бактерии (в большинстве своем принадлежащих роду *Streptomyces*), конститутивно продуцирующие антибиотики в больших количествах. В то же время она открывала легкий доступ к дешевым и высокоэффективным лекарственным препаратам природного и полусинтетического происхождения. Таким образом, эта платформа максимально соответствовала целям и задачам своего времени, поскольку во времена «золотой эры открытия антибиотиков» отсутствовала проблема неограниченного использования антибиотиков.

Роль антибиотиков в природе заключается в поддержании биологического разнообразия микроорганизмов за счет противостояния бактерий, продуцирующих и деградирующих антибиотики [5] с использованием разнообразных механизмов

[6–8], широко распространенных в различных экологических нишах [8–11] и появившихся задолго до возникновения человеческих цивилизаций [12]. Неконтролируемое использование больших количеств антибиотиков создало беспрецедентные условия для селекции и мобилизации генов резистентности среди популяций бактерий, а также их последующего захвата клетками патогенных микроорганизмов. Эволюция резистентности проходила с использованием трех основных механизмов [13]: первичного захвата генов устойчивости, в первую очередь, благодаря мобилизации и горизонтальному переносу генов из окружающей среды; возникновения компенсаторных мутаций, нивелирующих негативное влияние захвата генов устойчивости [14], и активации внутренних механизмов устойчивости, таких, как активный транспорт [15, 16]. Все это приводит к возникновению штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [17], особенно характерной для так называемых ESKAPE патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), представляющих реальную угрозу жизни и здоровью людей [17].

ОГРАНИЧЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНАТОРНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ХИМИЧЕСКИХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Комбинаторная химия и высокопроизводительный скрининг библиотек химических соединений зарекомендовали себя как эффективные методы создания лекарственных препаратов, нацеленных на регуляцию различных процессов в клетках человека.

Однако множественные попытки использования высокопроизводительного комбинаторного скрининга с целью создания новых антибиотиков широкого спектра действия потерпели неудачу, несмотря на значительные финансовые и материальные вложения, а также применение всех доступных технологий [18–20].

Основные причины этих неудач связаны тем, что, во-первых, ксенобиотики плохо проникают в бактериальные клетки (особенно грамотрицательные). Во-вторых, антибиотики не подчиняются классическому «правилу пяти» Липински [21] (физико-химические свойства комбинаторных химических библиотек, подобранные для большинства препаратов, не оптимальны для антибиотиков [22]). В-третьих, химическое разнообразие существующих библиотек заметно ограничено [23]. В то же время использование химических библиотек позволяет идентифицировать различные адъюванты, значительно усиливающие антимикробные свойства известных антибиотиков [24–26], антиметаболиты [27], антивирулентные препараты [28], а также может приводить к созданию препаратов узкого спектра, направленных на конкретную мишень, что показано на примере бедаквила, селективного ингибитора F_1F_0 -АТФ-азы *Mycobacterium tuberculosis* [29]. Создание специализированных химических библиотек, направленных на повышенную способность ксенобиотиков проникать в бактериальные клетки, важно для комбинаторных методов поиска новых антибиотических препаратов. Альтернативная стратегия – поиск лигандов, ингибирующих активность бактериальных систем транспорта ксенобиотиков.

ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПРИРОДНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Скрининг природных веществ приводит к значительно большей вероятности обнаружения антибиотической активности [30], по-видимому, в связи с тем, что природные вещества имеют более широкий спектр стереоселективных фармакофоров, уже отобранных на различную биологическую активность в процессе эволюции [23]. Метаболомика, лежащая в основе современных подходов к скринингу природных антибиотиков [26], представляет собой совокупность тандемных методов разделения–анализа, таких, как высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия или спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ВЭЖХ–МС или ВЭЖХ–ЯМР), и методов широкомасштабного секвенирования [31]. Метаболомика позволяет осуществить переход к функциональной геномике [32], а также идентифицировать новые рибосомные и нерибосомные пептиды [33, 34] и вторичные метаболиты [35].

Природные источники, используемые для поиска антибиотиков, весьма разнообразны и включают в себя экстракты растений, грибов, лишайников, эндофитов, морских растений, водорослей, кораллов и микроорганизмов [36]. Тем не менее, следует отметить, что многие действующие вещества из перечисленных источников действуют по неспецифическому механизму дестабилизации мембраны, что, в свою очередь, затрудняет их применение ввиду высокой токсичности, вызванной низким терапевтическим индексом. Таким образом, благодаря своему разнообразию и эволюционной предрасположенности к продукции антибиотиков для завоевания экологических ниш в процессе конкуренции друг с другом, бактерии продолжают оставаться одним из наиболее привлекательных источников антибиотической активности. Проблема «повторного открытия» антибиотиков может решаться с использованием разнообразных подходов.

СТРАТЕГИИ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ «ПЕРЕОТКРЫТИЯ» АНТИБИОТИКОВ

Подавление роста коллекции различных микроорганизмов может использоваться как своеобразный индивидуальный отпечаток исследуемого вещества или экстракта, что показано с помощью платформы BioMAP, позволяющей выявлять известные антибиотики, а также находить новые по индивидуальному профилю ингибирования [37]. Для обнаружения мишени действующего вещества или, наоборот, поиска веществ, обладающих специфическим механизмом действия, можно также использовать коллекции штаммов бактерий одного вида. Коллекция 245 штаммов *S. aureus* с подавленной экспрессией генов позволила идентифицировать антибиотик платенсимицин, принадлежащий к новому классу ингибиторов фермента синтеза жирных кислот FabF/B [38].

Новый взгляд на использование почвенных бактерий в качестве источника новых антибиотиков открывает новые подходы к скринингу антибиотической активности. Полногеномное секвенирование актиномицетов показало, что они обладают значительно более высокой способностью продуцировать вторичные метаболиты, чем при культивировании. Секвенирование *Streptomyces coelicolor* показало принципиальную возможность продукции более 20 вторичных метаболитов, в то время как при культивировании *in vitro* идентифицированы только три [39]. В свою очередь, активация молчащих генов бактерий–продуцентов открывает новые источники ранее неизвестных антибиотиков [40], а биоинформатический анализ и методы, основанные на кластеризации генов, позволяют предсказывать антибиотики *de novo* [41]. Таким образом, методы геномного

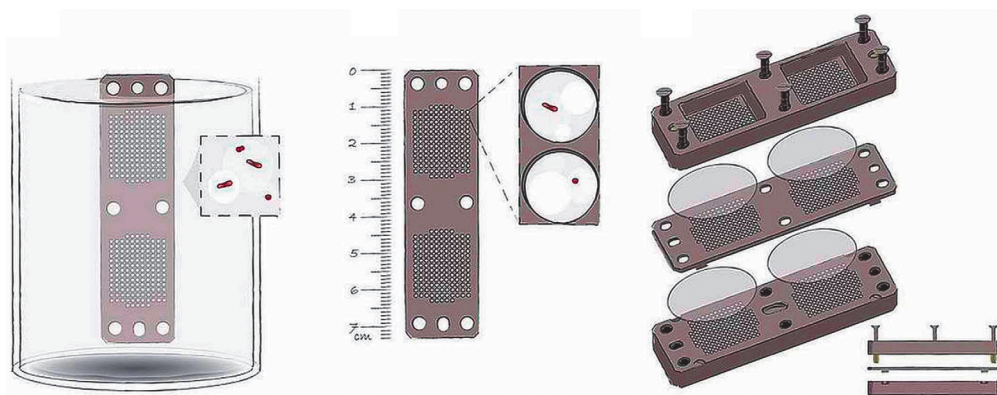


Рис. 2. Устройство для культивации «некультивируемых» бактерий почвы (адаптировано из [47]). Устройство состоит из двух частей, разделенных полупроницаемой мембраной. С одной стороны находятся индивидуальные клетки бактерий почвы в питательной среде, с другой – почва, несущая необходимые факторы роста

майнинга могут успешно использоваться с целью поиска новых вторичных метаболитов бактерий, в том числе и неизвестных ранее антибиотиков, обладающих высоким потенциалом для создания лекарственных препаратов [42].

Один из подходов к активации молчащих генов и продукции новых антибиотиков – подбор среды для культивирования клонов-продуцентов, предварительно отобранных на основании секвенирования, благодаря присутствию новых генов [43]. Использование факторов чувства кворума – это другой подход к активации молчащих генов [44], однако их эффект трудно предсказуем и, по-видимому, они не всегда представляют собой оптимальный механизм активации молчащих генов. В то же время одна из наиболее очевидных стратегий активации молчащих генов – это рекомбинантная экспрессия [45, 46]. Использование новых подходов к культивированию «некультивируемых» почвенных бактерий (рис. 2) – еще один альтернативный подход к проблеме поиска новых антибиотиков. Платформа, основанная на культивировании единичных почвенных бактерий в их природном окружении, с использованием полупроницаемой мембраны, позволила открыть новый антибиотик теиксобактин, активный по отношению к резистентным штаммам грамположительных бактерий без развития устойчивости [47], а также к идентификации нового рода *Entotheonella*, обладающего уникальным набором вторичных метаболитов и путей их синтеза [48].

Скрининг бактерий, устойчивых к антибиотикам, может использоваться для выявления новых механизмов синергического взаимодействия, открывающих возможности для поиска адъювантов антибиотиков, усиливающих их действие [26]. Использование резистентных штаммов позволило открыть новый класс антибиотиков – ацилдепсипептидов, активирующих внутриклеточную бактериальную протеазу ClpP [49], вызывающую гибель бактерий, в том числе и персистирующих, и приводящую к излечению

от хронической инфекции [50]. Предварительный отбор почвенных бактерий, устойчивых к росту на гликопептидных антибиотиках, позволил более чем в 1000 раз повысить вероятность обнаружения клонов-продуцентов новых антибиотиков этого класса и идентифицировать новый антибиотик пекискомицин, обладающий уникальной структурой [51].

Эффективным оказалось и создание бифункциональных агентов, работающих по принципу троянского коня. Конъюгат аналога антибиотика рифампицина, соединенного биodeградируемым линкером с антителом против тейхоевых кислот клеточной стенки *S. aureus*, показал свою эффективность в элиминации не только суспензионных клеток, но и внутриклеточного резервуара бактерий, устойчивого к действию ванкомицина [52]. При этом важное значение имеет правильный выбор антитела, линкера и антибиотика. Эффективным оказался рациональный дизайн высокоспецифичных антибиотиков в случае конъюгатов сидерофор-антибиотик [53].

Переход от ингибирования *in vitro* к непосредственной оценке антибиотической активности препарата *in vivo* открывает новые возможности для создания наиболее эффективных лекарственных средств. Скрининг антимикробной активности против *M. tuberculosis* с использованием зараженных макрофагов [54] позволяет максимально приблизить модель *in vitro* к условиям *in vivo*, а также исключить вещества, обладающие неспецифической цитотоксичностью и низкой способностью проникать в макрофаги. Использование моделей заражения нематоды *Caenorhabditis elegans* [55] и рыбок *Danio rerio* [56] *in vivo* позволяет отобрать соединения, приводящие к элиминации бактерий, в том числе и при помощи механизмов, отличных от классической антибиотической активности.

Высокая чувствительность аналитического сигнала является принципиальной характеристикой, необходимой для увеличения производительности скрининга. Использование бактерий, продуцирующих

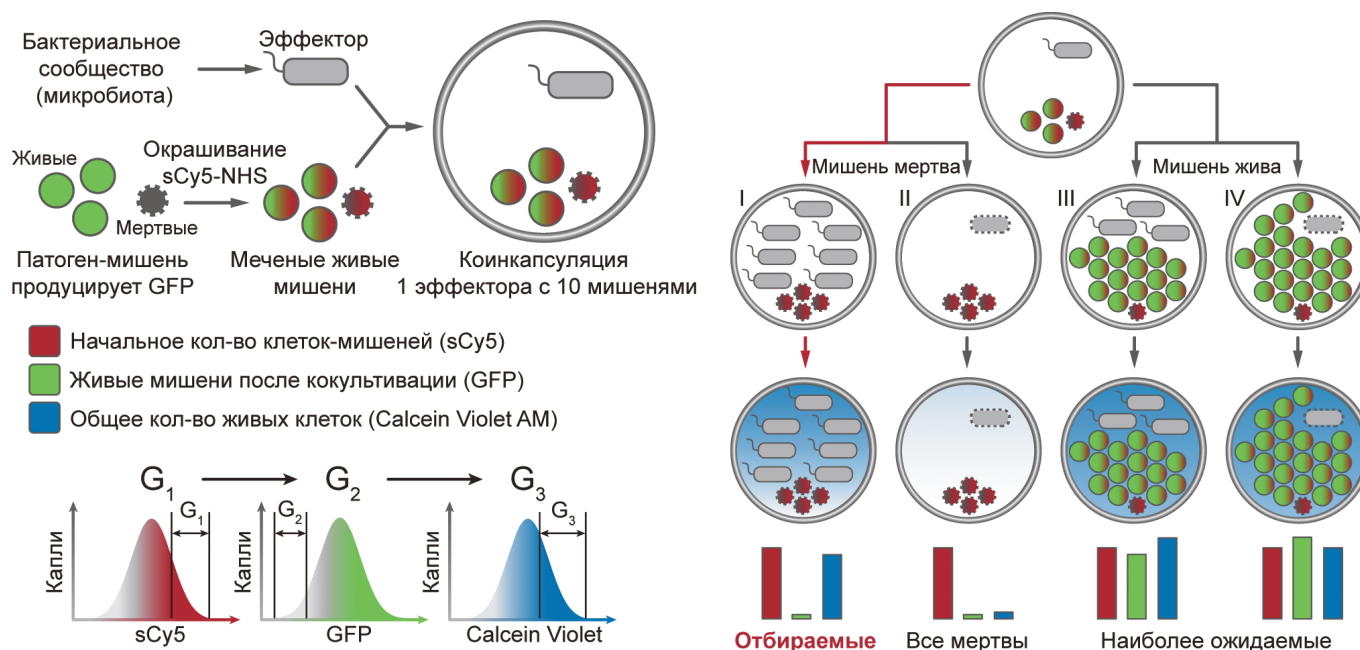


Рис. 3. Ультравысокопроизводительный (uHT) скрининг антибиотической активности в каплях биосовместимой двойной эмульсии (адаптировано из [64]). Культивация единичных клеток-эффекторов микробиоты с репортерным штаммом патогена-мишени с последующим прижизненным окрашиванием на наличие живых клеток, а также отбором целевой популяции клеток-эффекторов, обладающих антибиотической активностью с использованием FACS

рекомбинантные флуоресцентные белки-репортеры, в качестве биосенсора антибиотической активности позволяет напрямую детектировать подавление роста бактерий [57], идентифицировать антибиотики, действующие по заданному механизму ингибирования трансляции [58], а также производить скрининг комбинации антибиотиков с использованием нескольких флуоресцентных репортеров с различным спектром возбуждения/эмиссии [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ввиду быстрого возникновения антибиотикорезистентности, поиск новых антибиотиков становится весьма актуальной задачей. Скрининг химических библиотек имеет крайне низкую вероятность успеха, он эффективен в основном для поиска адъювантов антибиотиков и высокоспецифичных препаратов. Классическая платформа Ваксмана для скрининга антибиотической активности микроорганизмов оказалась эффективной в прошлом, однако в дальнейшем ее применение приводило к чрезвычайно высокой вероятности повторного открытия известных антибиотиков, в то время как обнаружение антибиотиков нового класса считается возможным лишь в результате скрининга более 10⁷ различных микроорганизмов [60]. Решить эту проблему можно за счет использования альтернативных платформ, основан-

ных на метаболомике, широкомасштабном секвенировании, биоинформатическом анализе, рекомбинантной экспрессии генов, а также альтернативных подходов к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов. Свидетельства того, что физиологически значимые антибиотики могут быть найдены среди представителей микробиоты человека [61], открывают новые источники для поиска антимикробной активности. Особый интерес представляет внедрение микрофлюидных платформ, позволяющих перейти от классической 2D-платформы скрининга на чашках к эмульсионному 3D-скринингу в изолированных микрокомпартаментах. Культивирование отдельных клеток в каплях эмульсии можно использовать для скрининга резистентных бактерий [62], а также бактериолитической активности [63]. Этот альтернативный подход открывает уникальные возможности для высокопроизводительного анализа активности широких репертуаров клеток.

Инкапсуляция индивидуальных клеток в каплях биосовместимой двойной эмульсии (рис. 3) позволяет не только анализировать активность на уровне единичных клеток, но и кокультивировать представителей микробиоты с клетками-мишенями с целью идентификации антагонистических штаммов, продуцирующих антибактериальные соединения [64]. Суть метода заключается в коинкапсуляции инди-

видуальных представителей микробиоты с репортерным штаммом патогена-мишени в каплях биосовместимой двойной эмульсии вода-масло-вода, их последующем кокультивировании в каплях и отборе с использованием клеточного сортирования целевой популяции капель, в которых наблюдается ингибирование роста патогена при наличии живых клеток-эффекторов микробиоты. Одно из неоспоримых преимуществ данной технологии – это возможность отбора целевой популяции бактерий-эффекторов, что позволяет добиться ультравысокопроизводительного ($\approx 30\,000$ клеток в секунду) скрининга антибиотической активности на уровне единичных клонов. В то же время отобранные в результате скрининга бактерии могут быть представителями чрезвычайно редких, медленно растущих и «некультивируемых» микроорганизмов, которых впоследствии идентифицируют, используя широкомасштабное секвенирование и последующий биоинформатический анализ. Данная платформа может быть использована для прижизненного отбора антимикробной активности единичных клеток из популяций клеток-эффекторов представительностью порядка 0.005% за один раунд селекции.

Дальнейшее развитие ультравысокопроизводительных (uHT) методов скрининга антибиотической активности представляет чрезвычайно высокий интерес, так как необычайно широкое разнообразие бактериальных сообществ таит в себе множество загадок, требующих комплексного понимания взаимодействий на уровне как единичных бактерий, так и каждого уникального микробиома в целом [65]. Использование комбинации методов uHT скри-

нинга и геномного майнинга открывает уникальные возможности с точки зрения направленного поиска новых редких кластеров биосинтеза вторичных метаболитов бактерий с различным спектром антибиотической активности. Такие проблемы, как анализ индивидуальной активности каждого представителя микробиоты по отношению к заданной мишени, а также широкомасштабная оценка спектра активности антибиотиков на заданное микробиологическое сообщество, представляют чрезвычайно высокий интерес, так как дают нам возможность распутать клубок взаимодействий внутри микробиологического сообщества. Мы считаем, что развитие микрофлюидных технологий в комплексе с методами ультравысокопроизводительного скрининга, широкомасштабного секвенирования, протеомики и биоинформатики позволит перейти на новый уровень понимания процессов в области микробиологии. Возможности микрофлюидной технологии ультравысокопроизводительного скрининга природных источников биоразнообразия микроорганизмов или искусственных библиотек антимикробных соединений имеют очевидную перспективу открытия антибиотиков следующего поколения, а также в реализации стратегии поиска лигандов, ингибирующих факторы резистентности микроорганизмов к существующим антибиотическим препаратам. Комбинированное использование таких препаратов может иметь ключевое значение для решения проблемы лекарственной устойчивости к антибиотикам. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
РНФ № 14-50-00131.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lewis K. // Nat. Rev. Drug Discov. 2013. V. 12. № 5. P. 371–387.
- Lewis K. // Nature. 2012. V. 485. № 7399. P. 439–440.
- Schatz A., Bugle E., Waksman S.A. // Exp. Biol. Medicine. 1944. V. 55. № 1. P. 66–69.
- Reller L.B., Weinstein M., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. // Clin. Infectious Dis. 2009. V. 49. № 11. P. 1749–1755.
- Kelsic E.D., Zhao J., Vetsigian K., Kishony R. // Nature. 2015. V. 521. № 7553. P. 516–519.
- Wright G.D. // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. № 3. P. 175–186.
- Perry J.A., Westman E.L., Wright G.D. // Curr. Opin. Microbiol. 2014. V. 21. P. 45–50.
- Kommineni S., Bretl D.J., Lam V., Chakraborty R., Hayward M., Simpson P., Cao Y., Bousounis P., Kristich C.J., Salzman N.H. // Nature. 2015. V. 526. № 7575. P. 719–722.
- Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O.A., Dantas G. // Science. 2012. V. 337. № 6098. P. 1107–1111.
- Finley R.L., Collignon P., Larsson D.G.J., McEwen S.A., Li X.-Z., Gaze W.H., Reid-Smith R., Timinouni M., Graham D.W., Topp E. // Clin. Infectious Dis. 2013. V. 57. № 5. P. 704–710.
- Forsberg K.J., Patel S., Gibson M.K., Lauber C.L., Knight R., Fierer N., Dantas G. // Nature. 2014. V. 509. № 7502. P. 612–616.
- D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W.L., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., et al. // Nature. 2011. V. 477. № 7365. P. 457–461.
- Brown E.D., Wright G.D. // Nature. 2016. V. 529. № 7586. P. 336–343.
- Andersson D.I., Hughes D. // FEMS Microbiol. Rev. 2011. V. 35. № 5. P. 901–911.
- Cox G., Wright G.D. // Internat. J. Med. Microbiol. 2013. V. 303. № 6–7. P. 287–292.
- Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F., et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 2. P. e1619.
- Davies J., Davies D. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 74. № 3. P. 417–433.
- Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L. // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. № 1. P. 29–40.
- Silver L.L. // Clin. Microbiol. Rev. 2011. V. 24. № 1. P. 71–109.
- Tommasi R., Brown D.G., Walkup G.K., Manchester J.I., Miller A.A. // Nat. Rev. Drug Discov. 2015. V. 14. № 8. P. 529–542.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. // Advanced Drug Delivery Rev. 1997. V. 23. № 1. P. 3–25.

22. O'Shea R., Moser H.E. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 10. P. 2871–2878.
23. Harvey A.L., Edrada-Ebel R., Quinn R.J. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. V. 14. № 2. P. 111–129.
24. Peterson E.J.R., Ma S., Sherman D.R., Baliga N.S. // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16078.
25. Taylor P.L., Rossi L., De Pascale G., Wright G.D. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 9. P. 1547–1555.
26. Roemer T., Boone C. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 4. P. 222–231.
27. Zlitni S., Ferruccio L.F., Brown E.D. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 12. P. 796–804.
28. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J., Kitao T., Righi V., Milot S., Tzika A., et al. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 8. P. e1004321.
29. Koul A., Vranckx L., Dhar N., Göhlmann H.W.H., Özdemir E., Neefs J.-M., Schulz M., Lu P., Mørtz E., McKinney J.D., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3369.
30. Sukuru S.C.K., Jenkins J.L., Beckwith R.E.J., Scheiber J., Bender A., Mikhailov D., Davies J.W., Glick M. // *J. Biomol. Screening.* 2009. V. 14. № 6. P. 690–699.
31. Glassbrook N., Beecher C., Ryals J. // *Nat. Biotech.* 2000. V. 18. № 11. P. 1142–1143.
32. Jewett M.C., Hofmann G., Nielsen J. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006. V. 17. № 2. P. 191–197.
33. Kersten R.D., Yang Y.-L., Xu Y., Cimermancic P., Nam S.-J., Fencical W., Fischbach M.A., Moore B.S., Dorrestein P.C. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 11. P. 794–802.
34. Ibrahim A., Yang L., Johnston C., Liu X., Ma B., Magarvey N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 47. P. 19196–19201.
35. Kjer J., Debbab A., Aly A.H., Proksch P. // *Nat. Protocols.* 2010. V. 5. № 3. P. 479–490.
36. Moloney M.G. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2016. V. 37. № 8. P. 689–701.
37. Wong W.R., Oliver A.G., Linington R.G. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. № 11. P. 1483–1495.
38. Wang J., Soisson S.M., Young K., Shoop W., Kodali S., Galgoczi A., Painter R., Parthasarathy G., Tang Y.S., Cummings R., et al. // *Nature.* 2006. V. 441. № 7091. P. 358–361.
39. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., et al. // *Nature.* 2002. V. 417. № 6885. P. 141–147.
40. Peter J., Rutledge G.L.C. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 8. P. 509–523.
41. Marnix H., Medema M.A.F. // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. № 9. P. 639–648.
42. Metev M., Osterman I.A., Ghilarov D., Khabibullina N.F., Yakimov A., Shabalin K., Utkina I., Travin D.Y., Komarova E.S., Serebryakova M., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. P. 1129.
43. Zazopoulos E., Huang K., Staffa A., Liu W., Bachmann B.O., Nonaka K., Ahlert J., Thorson J.S., Shen B., Farnet C.M. // *Nat. Biotech.* 2003. V. 21. № 2. P. 187–190.
44. Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H., Horinouchi S. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 34. № 1. P. 102–111.
45. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. // *Nat. Biotech.* 2003. V. 21. № 5. P. 526–531.
46. Komatsu M., Uchiyama T., Ōmura S., Cane D.E., Ikeda H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 6. P. 2646–2651.
47. Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., Conlon B.P., Mueller A., Schaberle T.F., Hughes D.E., Epstein S., et al. // *Nature.* 2015. V. 517. № 7535. P. 455–459.
48. Wilson M.C., Mori T., Ruckert C., Uria A.R., Helf M.J., Takada K., Gernert C., Steffens U.A.E., Heycke N., Schmitt S., et al. // *Nature.* 2014. V. 506. № 7486. P. 58–62.
49. Brotz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H.-P., Endermann R., Ladel C., Schroeder W., Hinzen B., Raddatz S., Paulsen H., Henninger K., et al. // *Nat. Med.* 2005. V. 11. № 10. P. 1082–1087.
50. Conlon B.P., Nakayasu E.S., Fleck L.E., LaFleur M.D., Isabella V.M., Coleman K., Leonard S.N., Smith R.D., Adkins J.N., Lewis K. // *Nature.* 2013. V. 503. № 7476. P. 365–370.
51. Thaker M.N., Wang W., Spanogiannopoulos P., Waglechner N., King A.M., Medina R., Wright G.D. // *Nat. Biotech.* 2013. V. 31. № 10. P. 922–927.
52. Lehar S.M., Pillow T., Xu M., Staben L., Kajihara K.K., Vandlen R., DePalatis L., Raab H., Hazenbos W.L., Hiroshi Morisaki J., et al. // *Nature.* 2015. V. 527. № 7578. P. 323–328.
53. Han S., Zaniewski R.P., Marr E.S., Lacey B.M., Tomaras A.P., Evdokimov A., Miller J.R., Shanmugasundaram V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 51. P. 22002–22007.
54. Pethe K., Bifani P., Jang J., Kang S., Park S., Ahn S., Jiricek J., Jung J., Jeon H.K., Cechetto J., et al. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. № 9. P. 1157–1160.
55. Ewbank J.J., Zugasti O. // *Disease Models Mechanisms.* 2011. V. 4. № 3. P. 300–304.
56. Veneman W.J., Stockhammer O.W., de Boer L., Zaat S.A.J., Meijer A.H., Spaik H.P. // *BMC Genomics.* 2013. V. 14. № 1. P. 1–15.
57. Michels K., Heinke R., Schone P., Kuipers O.P., Arnold N., Wessjohann L.A. // *J. Antibiot.* 2015. V. 68. № 12. P. 734–740.
58. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
59. FengTing Lv, LiBing Liu, Shu Wang // *Sci. China Chem.* 2014. V. 57. № 12. P. 1696–1702.
60. Baltz R.H. // *SIM News.* 2005. V. 55. P. 186–196.
61. Zipperer A., Konnerth M.C., Laux C., Berscheid A., Janek D., Weidenmaier C., Burian M., Schilling N.A., Slavetinsky C., Marschal M., et al. // *Nature.* 2016. V. 535. № 7613. P. 511–516.
62. Liu X., Painter R.E., Enesa K., Holmes D., Whyte G., Garlisi C.G., Monsma F.J., Rehak M., Craig F.F., Smith C.A. // *Lab on a Chip.* 2016. V. 16. № 9. P. 1636–1643.
63. Scanlon T.C., Dostal S.M., Griswold K.E. // *Biotechnol. Bioengin.* 2014. V. 111. № 2. P. 232–243.
64. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
65. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018. doi: 10.1073/pnas.1811250115.