

УДК 577.21; 579.23

Новый ингибитор трансляции – производное имидазола

Д. А. Лукьянов^{1,6*}, В. С. Був², Я. А. Иваненков^{3,4}, В. Г. Карцев⁵, Д. А. Скворцов^{6,7},
И. А. Остерман^{1,6,8}, П. В. Сергиев^{1,2,6,9}

¹Сколковский институт наук и технологий, Центр наук о жизни, Сколково, 143028 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

³Институт биохимии и генетики РАН, Уфимский научный центр, Уфа, 450054 Россия

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова, Москва, 127055 Россия

⁵InterBioScreen Ltd, Черноголовка, 142432 Россия

⁶Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

⁷Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

⁸Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи, 354340 Россия

⁹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва, 119991 Россия

*E-mail: Dmitrii.Lukianov@skoltech.ru

Поступила в редакцию 18.12.2021

Принята к печати 10.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11654

РЕФЕРАТ Поиск новых антибиотиков и изучение механизма их действия представляют важную задачу. Одной из главных мишеней, на которые направлено действие антибиотиков в клетках бактерий, является рибосома. Даже если найденная молекула по тем или иным причинам не подходит для клинического применения, изучение механизма ее действия может углубить знания о работе рибосомы и послужить в дальнейшем базой для усовершенствования антибактериальных препаратов. В представленной статье рассмотрен новый ингибитор синтеза белка, исследование которого может быть полезным для модификации существующих ингибиторов синтеза белка. Нами показано, что 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид ингибирует синтез белка как *in vivo*, так и *in vitro*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА трансляция, бактерии, ингибитор трансляции, вещества с антибиотической активностью, производные имидазола.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавирусной инфекции подняла на новую высоту проблему уязвимости человеческой популяции для патогенных микроорганизмов. Не утешителен и прогноз распространения антибиотикорезистентности бактерий. Согласно данным Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), в 2015 году примерно 17% инфекционных заболеваний в странах, входящих в ОЭСР, вызваны резистентными к антибиотикам бактериями. В Российской Федерации число таких заболеваний превышает 40% [1]. По данным на 2016 год ежегодно от инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам, умирают порядка 700000 человек. Согласно прогнозу, опубликованному в 2016 году, к 2050 году смертность от инфекций,

вызванных устойчивыми формами бактерий, может вырасти до 10 млн человек [2]. Таким образом, перед современной наукой остро стоит задача поиска новых антибиотиков.

Синтез белка – жизненно важный процесс, в ходе которого генетическая информация, содержащаяся в мРНК, транслируется в аминокислотную последовательность белка, происходит на рибосомах. Бактериальная рибосома состоит из трех рибосомных РНК (16S, 23S, 5S) и более чем из 50 белков, образующих две субъединицы: малую 30S и большую 50S, которые, объединяясь, образуют 70S рибосому. Каждая из этих субъединиц, а также тоннель, через который выходит новосинтезированный пептид, служит мишенью для большого числа антибиотиков [3]. Так тетрациклин [4], стрептомицин [5], пакто-

мицин [6] и амикумадин А [6] связываются с малой субъединицей рибосомы. Определена структура комплекса с рибосомой для каждого из этих антибиотиков. Хлорамфеникол [7], клиндамицин [8] и бластицидин С [9] способны связываться с большой субъединицей рибосомы, что приводит к остановке синтеза белка. Антибиотики тетраценомицин Х [10], клебсазолицин [11] и эритромицин [7] блокируют выход пептида из рибосомы. Согласно опубликованным данным, более половины всех лекарственных средств, используемых при инфекционных заболеваниях, относятся к ингибиторам синтеза белка [12]. Поэтому понимание работы рибосомы может быть полезным как при поиске новых лекарственных средств, так и для улучшения уже известных. Нами описан новый ингибитор трансляции, понимание механизма действия которого может быть востребовано и фундаментальной наукой, и, после доработки, практическим здравоохранением.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использование двойной репортерной системы для анализа механизма действия антибиотиков

Механизм действия антибиотиков изучали с использованием репортерной системы pDualrep2 [13]. Для проведения анализа ночную культуру клеток *Escherichia coli* JW5503 [14], замороженную в 50% глицерине, разбавляли в 10 раз в жидкой среде LB и высевали газоном на чашки Петри с 1.5% LB-агаром и ампициллином (50 мкг/мл). Чашки подсушивали, затем при помощи роботизированной станции Janus (Perkin Elmer, США) на их поверхность наносили по 96 образцов разных молекул (рис. 1). Перед нанесением молекулы растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, ООО «ФармаМед», Россия) до концентрации 20 мг/мл. Вносили по 30 мкг каждой молекулы. После нанесения чашки с клетками

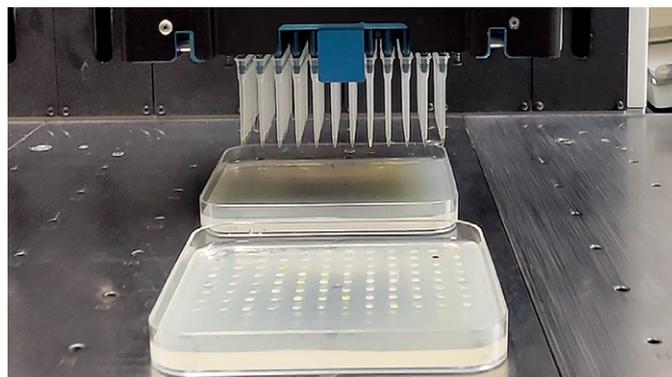


Рис. 1. Нанесение 96 индивидуальных молекул на чашки с клетками

инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C. Для визуализации результатов чашки сканировали при помощи ChemiDoc (Bio-Rad, США) в каналах Cy3 (для детекции TurboRFP) и Cy5 (для детекции Katushka2S).

Измерение минимальной ингибирующей концентрации

Минимальную ингибирующую концентрацию измеряли в 96-луночных планшетах. Ряды планшета (1–11) заполняли суспензией клеток *E. coli* JW5503, полученной путем разбавления ночной культуры в 200 раз. В первый ряд добавляли 200 мкл клеток, в последующие по 100 мкл. Последний (12) ряд планшета заполняли питательной средой LB без клеток для контроля чистоты эксперимента.

В ячейки первого ряда добавляли 2 мкл тестируемого соединения (в концентрации 20 мг/мл), после чего готовили серию двукратных разведений в последующих рядах (до десятого). Для этого 100 мкл смеси восьмиканальной пипеткой переносили из первой ячейки во вторую, смешивали и повторяли процедуру до 10 ряда. В качестве контроля в один из рядов каждого планшета вместо исследуемого вещества добавляли 2 мкл эритромицина (5 мг/мл). После этого планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи с аэрацией при 200 об/мин. О концентрации клеток судили по величине оптической плотности (A_{600}). Измерения проводили на планшетном ридере Victor X5 2030 (Perkin Elmer).

За минимальную ингибирующую концентрацию принимали наименьшую концентрацию исследуемого вещества, которая обеспечивала полное подавление роста бактерий.

Тест на цитотоксичность

Цитотоксичность исследуемого вещества проверяли методом МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) [15] с некоторыми модификациями. 2500 клеток на лунку для клеточных линий MCF7, HEK293T и A549 или 4000 клеток на лунку для клеточной линии VA-13 высевали в 135 мкл среды DMEM-F12 (Gibco, США) в 96-луночный планшет и инкубировали в 5% CO₂ в инкубаторе в течение первых 16 ч без обработки. Затем к клеткам добавляли по 15 мкл смеси среды и DMSO раствора испытуемого вещества (конечные концентрации DMSO в средах составляли 1% или менее), обработка клеток велась в течение 72 ч 100 нг/мл – 200 мкг/мл (8 разведений), на каждое разведение было три повторности, в качестве контрольного вещества использовался доксорубин. Затем к клеткам добавляли МТТ (ООО «ПанЭко»,

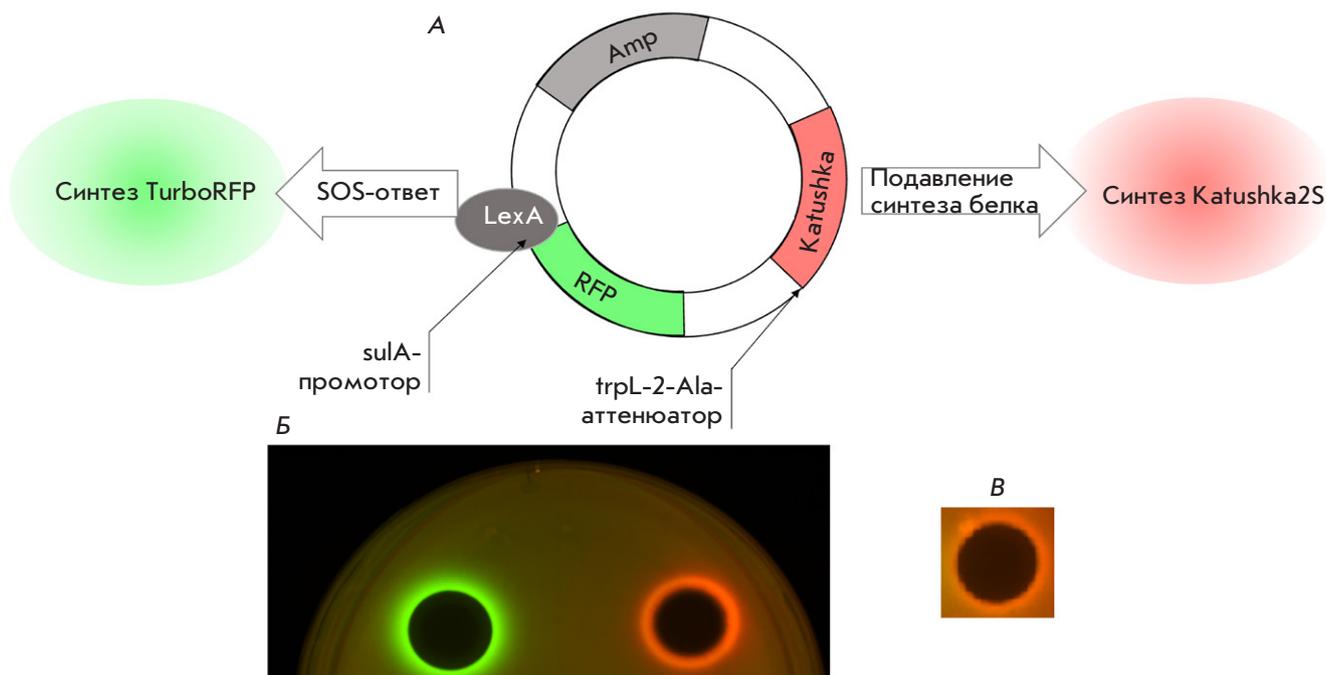


Рис. 2. А – строение репортерной плазмиды pDualrep2. Б – индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам трансляции или веществам, повреждающим ДНК. Капли эритромицина (справа, 2 мкг), левофлоксацина (слева, 0.05 мкг) наносили на поверхность чашки с агаром, содержащей клетки *E. coli* JW5503, трансформированные плазмидой pDualrep2. Экспрессия Katushka2S (красный) запускается ингибиторами трансляции, а экспрессия TurboRFP (зеленый) индуцируется при повреждении ДНК. В – индукция двойной репортерной системы молекулой 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлоридом (30 мкг)

повреждающие соединения активируют SOS-ответ в клетке, что приводит к диссоциации белка-репрессора LexA с промотора *sulA* и запуску экспрессии гена красного флуоресцентного белка TurboRFP (рис. 2Б, показано зеленым псевдоцветом).

В ходе высокопроизводительного поиска в библиотеках химических соединений, предоставленных компанией InterBioScreen Ltd, среди веществ, проявляющих антибиотическую активность, найдена молекула, не только подавляющая рост штамма *E. coli* JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, но и индуцирующая экспрессию гена *Katushka2S*, свойственную трансляционным ингибиторам (рис. 2В). Формула данной молекулы – 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида, представлена на рис. 3А (STOCK4S-33513). При этом в ходе поиска были проверены два аналога данной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-

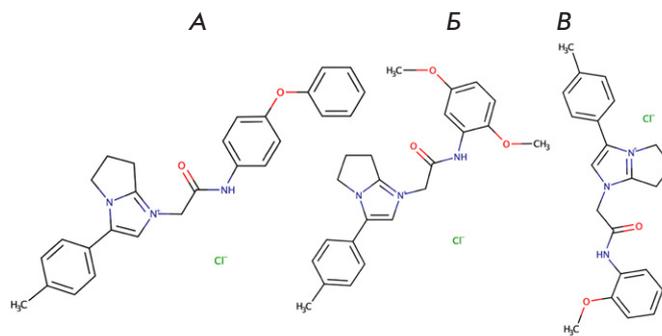


Рис. 3. А – структурная формула активной молекулы 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513). Б – структурная формула аналога активной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-37310). В – структурная формула аналога активной молекулы 1-(2-((2-метоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-72264)

имидазол-1-ий хлорид (STOCK4S-37310, рис. 3Б) и 1-(2-((2-метоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид (STOCK4S-72264, рис. 3В). Эти молекулы не давали зон ингибирования роста штамма *E. coli* JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, в тесте на твердой агаризованной среде, поэтому дальнейшие эксперименты проводили только с использованием молекулы 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид.

В тесте на штамме *E. coli* BW25113, трансформированном репортерной плазмидой, данная молекула активности не проявила.

Измерение минимальной ингибирующей концентрации

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом последовательных разведений на штамме *E. coli* JW5503 с делецией гена *tolC* [14]. Минимальная ингибирующая концентрация 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида равна 3.1 мкг/мл. Это сопоставимо с ингибирующей концентрацией такого природного ингибитора синтеза белка, как эритромицин, минимальная ингибирующая концентрация которого на данном штамме составила 3.1 мкг/мл.

Измерение цитотоксичности на эукариотических клетках

Токсичность данного соединения была проверена на нескольких культурах клеток человека в МТТ-тесте. К сожалению, для клеток человека это соединение оказалось более токсичным, чем для бактериальных клеток, что делает его непригодным (в данной форме) для использования в качестве лекарственного средства. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Данные МТТ-теста для 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида

Клеточная линия	Концентрация*, мкг/мл
HEK293T	0.2 ± 0.1
MCF7	1.8 ± 0.5
A549	0.5 ± 0.1
VA-13	0.4 ± 0.2

*Концентрация, в которой исследуемая молекула токсична для клеток, мкг/мл.

Трансляция в бесклеточной системе

Реакцию трансляции в бесклеточной системе проводили с использованием набора *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates от компании Promega. Синтез люциферазы светлячка в данном эксперименте определяли, используя реакцию окисления люциферина в оксилуциферин. Если в реакционной смеси присутствует ингибитор трансляции, то люцифераза не синтезируется и люциферин не разлагается. Результаты каждого эксперимента нормировали по растворителю (диметилсульфоксиду), добавленному в том же объеме, что и раствор исследуемого вещества. Данные для 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) приведены на рис. 4.

Исходя из полученных результатов можно констатировать, что молекула 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) является ингибитором трансляции.

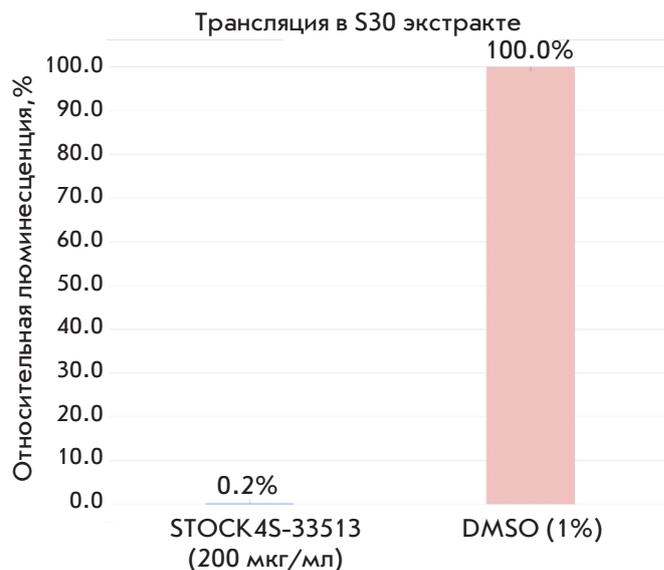


Рис. 4. Трансляция в бесклеточной системе на основе лизата *E. coli* (Promega) с добавлением 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513), взятого в концентрации 200 мкг/мл. За 100% взят сигнал от люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе, без добавления ингибиторов трансляции

Анализ места остановки рибосом

Метод тоупринт позволяет не только подтвердить, является ли соединение ингибитором синтеза белка или нет, но и дает возможность предположить, на каком именно этапе произошла остановка трансляции. Суть метода состоит в том, что в бесклеточной системе, основанной на индивидуально выделенных компонентах трансляции, в присутствии исследуемого вещества синтезируется короткий пептид. К реакционной смеси добавляется радиоактивно меченный праймер, комплементарный 3'-концевому участку мРНК, РНК-зависимая-ДНК-полимераза и 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. После этого происходит удлинение праймера по матрице РНК до тех пор, пока РНК-зависимая-ДНК-полимераза не встретится с рибосомой или не дойдет до конца матрицы. Если в смесь добавлен ингибитор синтеза белка, то рибосома остановится на матрице и не позволит РНК-зависимой-ДНК-полимеразе дойти до конца матрицы и фрагмент кДНК будет коротким. Точную длину фрагмента кДНК и место остановки рибосомы на мРНК можно рассчитать, исходя из последовательности РНК и положения продукта обратной транскрипции в геле относительно продуктов секвенирования по Сэнгеру, разделяемых в соответствующих дорожках геля. В типичном эксперименте мы также сравниваем места остановки рибосомы новыми и известными ингибиторами трансляции. Расстояние между первым нуклеотидом Р-сайта заблокированной на мРНК рибосомы и последним синтезированным нуклеотидом кДНК составляет 16 н. Для сравнения удобно использовать антибиотик тиострептон, который, как известно, останавливает рибосому на первом шаге трансляции в тот момент, когда в Р-сайте рибосомы находится стартовый кодон AUG. Исходя из этих данных мы провели расчет кодонов, которые были в Р-сайте на момент остановки рибосомы (рис. 5). Этими кодонами оказались 1-AUG (M), 2-UAU (Y), 8-CAG (Q). Однако если посмотреть на контроль без добавления антибиотика DMSO, то можно увидеть те же небольшие остановки на тех же местах, но менее выраженные. Это позволяет выдвинуть гипотезу, согласно которой данный ингибитор трансляции может влиять на кинетику синтеза белка на участках мРНК, которые рибосома проходит с большим трудом.

ВЫВОДЫ

В ходе работы исследован новый ингибитор бактериальной трансляции 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид, найденный в химической библиотеке. Показано, что эта моле-

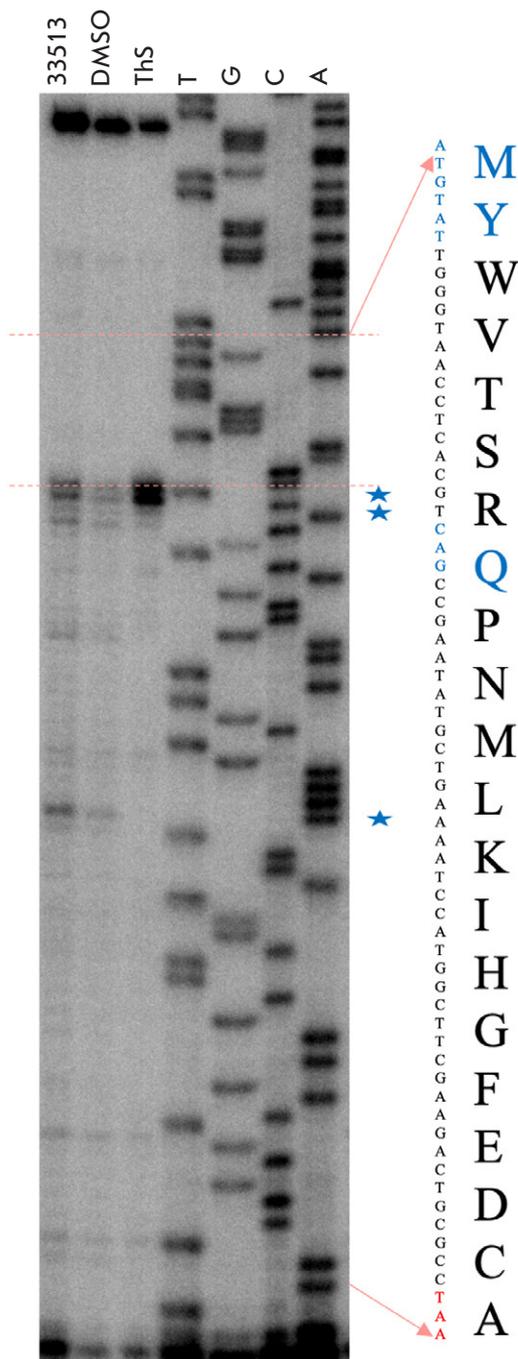


Рис. 5. Схема тоупринт-анализа на матрице RST1. 33513 – система трансляции с добавлением исследуемого вещества – 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) в концентрации 200 мкг/мл. DMSO – отрицательный контроль (DMSO 1%); ThS – в систему трансляции добавлен контрольный антибиотик тиострептон в концентрации 50 мкМ (останавливает трансляцию на старт-кодоне [18]), T, G, A, C – секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах

кула индуцирует репортерную систему и выступает как ингибитор трансляции *in vivo*. Установлено, что данная молекула может ингибировать трансляцию *in vitro*, а также усиливает остановку рибосомы в ходе синтеза небольших пептидов. Несмотря на то что это соединение не может использоваться в качестве лекарственного средства, поскольку проявляет высокую токсичность в отношении клеток

человека, более детальное исследование данной молекулы может дать более полное понимание функционирования такой важной молекулярной машины, как рибосома. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-34-90048.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stemming the Superbug Tide. Paris: OECD Publishing, 2018. 224 p.
2. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally. L.: Government of the United Kingdom, 2016. 84 p.
3. Ramakrishnan V. // Cell. 2002. V. 108. № 4. P. 557–572.
4. Jenner L., Starosta A.L., Terry D.S., Mikolajka A., Filonava L., Yusupov M., Blanchard S.C., Wilson D.N., Yusupova G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 10. P. 3812–3816.
5. Demirci H., Murphy F., Murphy E., Gregory S.T., Dahlberg A.E., Jogle G. // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 1355.
6. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusochev P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., et al. // Mol. Cell. 2014. V. 56. № 4. P. 531–540.
7. Bulkley D., Innis C.A., Blaha G., Steitz T.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 40. P. 17158–17163.
8. Dunkle J.A., Xiong L., Mankin A.S., Cate J.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 40. P. 17152–17157.
9. Svidritskiy E., Ling C., Ermolenko D.N., Korostelev A.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 30. P. 12283–12288.
10. 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., et al. // Nat. Chem. Biol. 2020. V. 16. № 10. P. 1071–1077.
11. Metelev 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. № 10. P. 1129–1136.
12. Lin J., Zhou D., Steitz T.A., Polikanov Y.S., Gagnon M.G. // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 451–478.
13. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
14. 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. V. 2. P. 2006.0008.
15. Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
16. Orelle C., Szal T., Klepacki D., Shaw K.J., Vázquez-Laslop N., Mankin A.S. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 14. P. e144.
17. Li X.Z., Plésiat P., Nikaido H. // Clin. Microbiol. Rev. 2015. V. 28. № 2. P. 337–418.
18. Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M.M., Liu H., Ochabowicz A., Quan S., Pham V.C., Squires C.L., Murphy B.T., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. № 12. P. 5994–6004.