

УДК 577.2

Гетерологическая продукция антимикробных пептидов в дрожжах позволяет проводить массированную оценку активности ДНК-кодируемых антимикробных агентов *in situ*

С. О. Пипия¹, А. О. Иванова¹, Ю. А. Мокрушина^{1,2}, И. Е. Елисеев¹, А. Г. Габибов^{1,2},
И. В. Смирнов^{1,2}, С. С. Терехов^{1*}

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: sterekhoff@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023

Принята к печати 07.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27355

РЕФЕРАТ Кризис антибиотикорезистентности бросает вызов глобальной системе здравоохранения. Классические антибиотики все чаще становятся неэффективными в клинической практике. Более того, введение в клиническую практику новых антимикробных агентов в горизонте всего нескольких лет приводит к возникновению антибиотикорезистентных штаммов патогенов. Таким образом, разработка платформ массированного создания и поиска новых антимикробных агентов представляет особую значимость в условиях возникновения антибиотикорезистентных штаммов патогенов и частой неэффективности классических антибиотиков. Массированный поиск позволит многократно сократить время, необходимое для идентификации наиболее перспективных лекарственных кандидатов. ДНК-кодируемые антимикробные агенты, в свою очередь, открывают уникальные возможности для широкомасштабного создания новых антибиотиков. В данной работе клетки дрожжей *Pichia pastoris* были генетически модифицированы с целью продукции панели антимикробных пептидов (АМП) и последующего высокопроизводительного отбора продуцентов АМП, подавляющих рост бактерий *in situ*. Наибольшей антимикробной активностью обладали дрожжевые клоны-продуценты танатина и протегрина-1. При этом уровень продукции рекомбинантного танатина был значительно выше, чем протегрина-1, что коррелирует с данными о его низкой токсичности. Разработанные методы массированной оценки активности ДНК-кодируемых антимикробных агентов позволяют идентифицировать лекарственные кандидаты с повышенным терапевтическим индексом. Развитие методов направленного создания искусственного разнообразия АМП и использование технологий глубокого функционального профилирования антимикробной активности позволяют разработать новые АМП с улучшенными терапевтическими характеристиками.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды, дрожжи *Pichia pastoris*, гетерологическая продукция, поиск матриц, протегрин-1, танатин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АМП – антимикробные пептиды; GAP – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; GFP – зеленый флуоресцентный белок; NGS – секвенирование нового поколения.

ВВЕДЕНИЕ

Распространение антибиотикорезистентности приводит к снижению эффективности традиционных антибиотиков широкого спектра, что ограничивает возможности лечения бактериальных инфекций [1]. Также увеличивается обеспокоенность по поводу развития перекрестной резистентности [2, 3]. Все

это делает необходимым расширение спектра и масштаба скрининга потенциальных антибиотиков, чтобы противостоять быстрым темпам адаптации микроорганизмов к лекарственным средствам [4, 5].

Природные источники являются обширным ресурсом веществ, обладающих антимикробной активностью, однако поиск и наработка таких соединений

часто ограничены культивируемыми и высокопредставленными штаммами микроорганизмов [6]. Это, в свою очередь, порождает проблему переоткрытия уже известных антибиотиков. Одним из способов решения данной проблемы является применение ультравысокопроизводительного скрининга образцов из разнообразных источников [7]. Такой подход позволяет находить вещества разной химической природы. Однако дальнейшее изменение свойств таких антибиотиков требует привлечения химического синтеза или культивирования продуцента и разработки целевого вещества для последующих экспериментов, связанных с его модификацией.

Перспективным классом альтернативных антибиотиков являются антимикробные пептиды (АМП) [8]. Природные антимикробные пептиды, активные в отношении грамотрицательных бактерий, представляют исключительный интерес в рамках борьбы с распространением внутрибольничных инфекций и антибиотикорезистентности [9]. Одним из преимуществ АМП является их генетически кодируемая природа и простой биосинтетический путь, который можно адаптировать к продукции в гетерологичном продуценте. Это позволяет легко вносить изменения в структуру и упрощает процедуру скрининга и улучшения фармакологических свойств АМП. Анализ баз данных пептидов позволяет проводить поиск новых АМП в природных источниках [10]. С этой целью используют также анализ метагеномных и протеомных данных, из которых вычленивают потенциальные АМП и затем проверяют их антимикробную активность [11, 12].

Другой подход – использование искусственного разнообразия молекул на основе рационального дизайна и *de novo* подходов. Созданные библиотеки вариантов АМП получают и проверяют с использованием технологий химического синтеза [13], фогового [14] или дрожжевого дисплея [15]. Широкое развитие в последние годы получили технологии *de novo* дизайна АМП с использованием искусственного интеллекта и нейросетей [16]. Многие подобные подходы опираются на методы направленной эволюции, имитируя природный процесс при создании новых молекул. Выбор стартовой точки для генерирования новой молекулы крайне важен для навигации по поверхности эволюционного ландшафта (рис. 1). Это позволит анализировать разнообразные пути направленной эволюции и находить наиболее подходящие варианты. При такой постановке начальных условий сокращается вероятность следования по тупиковой, единообразной эволюционной ветви.

В настоящее время цитотоксичность, а также механизмы действия АМП оценивают на искусственных системах, использующих в качестве модель-

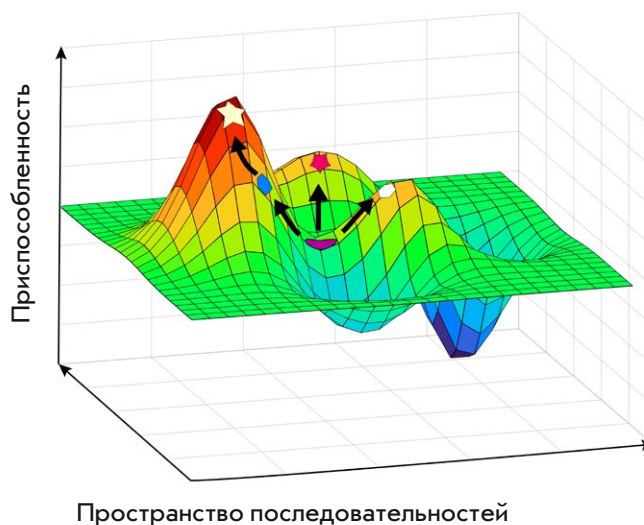


Рис. 1. Схематическое представление процесса направленной эволюции в координатах пространства последовательностей и приспособленности

ных мембран везикулы, липосомы и искусственные мембраны [17]. Данные методы позволяют приближенно оценить, как происходят взаимодействия пептидов с бактериальными или эукариотическими мембранами, однако они проводятся уже после этапов первичного скрининга антимикробной активности и отбора активных пептидов. Чтобы сократить количество этапов проверки и увеличить пропускную способность исследований, можно использовать продукцию АМП в эукариотической клетке, и напрямую оценивать антимикробную активность продуцента. В подобной гетерологической системе потенциально цитотоксические пептиды не будут иметь высокий выход или будут существенно влиять на рост популяции продуцента. Таким образом можно сократить число вариантов для дальнейшего более тщательного исследования свойств отобранных АМП. Подобный подход может значительно ускорить время анализа.

В качестве подобного гетерологического продуцента интерес представляют дрожжи *Pichia pastoris*, которые совмещают все особенности эукариотической клетки, включая способность к посттрансляционным модификациям, со скоростью роста, сопоставимой с бактериальной, и высоким уровнем продукции рекомбинантных белков [18].

Данная работа направлена на исследование особенностей гетерологической продукции АМП в дрожжах и применение рекомбинантных технологий к поиску матриц для создания новых антимикробных пептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные и дрожжевые штаммы

Использовали метилотрофные дрожжи *P. pastoris* GS115 (Invitrogen, США), клонирование и наработку плазмид осуществляли в клетках *Escherichia coli* XL-Blue («Евроген», Россия), в качестве таргетной бактерии использовали *E. coli* Δ lptD (любезно предоставлена И.А. Остерманом).

Клонирование генов АМП

Экспрессионный вектор pGAP4 получен путем замены промотора P_{AOX1} в векторе pPIC9k (Invitrogen) последовательностью промотора P_{GAP} из вектора pGAPZa (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с помощью набора HiFi DNA assembly kit (New England Biolabs, Великобритания).

Нуклеотидные последовательности генов АМП оптимизировали с использованием программы GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific Inc.) для продукции в клетках *P. pastoris*. Гены синтезировали методом ПЦР с взаимно перекрывающимися праймерами и клонировали в экспрессионный вектор pGAP4 с помощью набора HiFi DNA assembly kit (New England Biolabs). Клонированные гены АМП располагались в единой рамке считывания с геном альфа-фактора дрожжей, обеспечивающим секрецию пептидных молекул в культуральную среду. В процессе транспорта последовательность альфа-фактора процессируется эндопептидазой KEX2, и в культуральную среду выделяется пептид в активной форме. Библиотека АМП в векторе pGAP_AMP была линейаризована по сайту рестрикции AvrII для дальнейшей трансформации в клетки дрожжей.

Трансформация дрожжевых клеток

Клетки дрожжей *P. pastoris* GS115 трансформировали линейаризованной библиотекой плазмид pGAP_AMP согласно протоколу [19]. Трансформированные клетки дрожжей отбирали на агаризованной среде RDB (1 М сорбитол, глюкоза 20 г/л, YNB 13.4 г/л, биотин 0.4 мг/л, 0.005 г/л незаменимых аминокислот (L-глутаминовая кислота, L-метионин, L-лизин, L-лейцин и L-изолейцин), агар 18 г/л) и растили в воздушном термостате при 30°C в течение 72 ч.

Анализ антимикробной активности

Трансформированные клоны дрожжевой библиотеки высевали на чашки с питательной средой YPD-агар (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 100 мМ калий-фосфатного буфера pH 6.0, 1.8% агар-агара) и инкубировали при 30°C в течение

48 ч. Бактерию-мишень *E. coli* Δ lptD GFP высевали в ночную культуру. Мягкий агар (0.8% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.25% NaCl и 0.5% агарозы) инокулировали ночной культурой бактерии-мишени до конечной концентрации 10^5 КОЕ/мл, покрывали им колонии дрожжей и инкубировали при 37°C в течение 18 ч до образования зон ингибирования роста.

Анализ уровня продукции АМП в жидкой культуре

Дрожжевые штаммы-продуценты АМП культивировали в питательной среде YPD (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 100 мМ калий-фосфатного буфера pH 6.0) в колбах на качалке при 30°C и 180 об/мин в течение ночи. Через 24, 48 и 72 ч отбирали аликвоты среды, которые анализировали методом электрофореза в трициновом буфере в полиакриламидном геле в соответствии с протоколом [20]. Уровень продукции АМП оценивали по интенсивности окрашивания полос красителем Кумасси.

Идентификация пептидов у клонов с антимикробной активностью

Активные дрожжевые клоны выращивали на селективной среде RDB. Геномную ДНК выделяли с использованием ацетата лития и SDS согласно протоколу [21]. Гены АМП амплифицировали методом ПЦР с использованием фланкирующих праймеров: Forw 5'-TGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTGGAGAAAAG-3' и Rev 5'-GAACTGAGGAACAGTCATGTCTAAGGCTACAAA-3'. ПЦР-продукты секвенировали методом Сэнгера, ген пептида идентифицировали, выравнивая полученную нуклеотидную последовательность по последовательности генов АМП из панели.

Выделение геномной ДНК дрожжей и подготовка образцов для NGS-секвенирования

Геномную ДНК выделяли из объединенного пула трансформированных клонов дрожжей согласно протоколу [21]. Гены АМП амплифицировали с помощью эмульсионной ПЦР (эПЦР) согласно протоколу [22] с использованием праймеров, указанных выше. Полученный пул ПЦР-продуктов был дополнительно очищен с помощью магнитных частиц VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme, Китай).

NGS-секвенирование

Подготовленные ПЦР-продукты амплифицировали с использованием набора REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием генетического анализатора HiSeq2500,

Таблица 1. Панель АМП с выраженной антимикробной активностью

Антимикробный пептид	Аминокислотная последовательность*	Размер, число а.о.	Тип структуры
TP4	FIHHIIGGLFSAGKAIHRLIRRRRR	25	β-шпилька
Протегрин-1	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	18	β-шпилька
Магаинин-1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	23	α-спираль
Мелиттин	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	26	α-спираль
Мастопаран	INLKAIAALAKKLF	14	α-спираль
Танатин	GSKKPVPPIYCNRRTGKQCQM	21	β-шпилька
HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC	30	β-шпилька
Тахиплезин-1	KWCFRVCYRGICYRRCR	17	β-шпилька
Индолицидин	ILPWKWPWWPWRR	13	α-спираль
Арминин 1a	KPWRFRRAIRRVWRKVAPYIPFVVKTVGKK	31	α-спираль

*Аминокислотная последовательность, длина и структура АМП уточнены в APD3 [23] и DBAASP [24].

HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot и HiSeq SBSKit v4 (250 циклов) (Illumina, США) в соответствии с инструкциями производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор панели антимикробных пептидов из баз данных АМП

Опираясь на базы данных АМП, такие как APD3 [23] и DBAASP [24], была составлена панель АМП с выраженной антимикробной активностью (табл. 1).

Проверка универсальности применения дрожжей в качестве гетерологического продуцента АМП требует валидации на панели АМП с разнообразными физико-химическими характеристиками. Опираясь на данный критерий, мы выбирали последовательности АМП с учетом относительно высокой антимикробной активности, разнообразия структуры и длины аминокислотной последовательности. Таким образом была составлена панель АМП, охватывающая широкий спектр структурных матриц.

Создание генетических конструкций панели АМП и трансформация клеток дрожжей

Нуклеотидные последовательности генов антимикробных пептидов оптимизировали с помощью программного обеспечения GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific Inc.), и синтезированные фрагменты клонировали в дрожжевой вектор для секретируемой продукции pGAP4_AMP (рис. 2). Благодаря наличию сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP) для продукции целевых

пептидов не требуется добавление индуктора. Полученные генетические конструкции трансформировали в клетки дрожжей единым пулом. С 1 мкг библиотеки плазмид получено 10^4 дрожжевых клонов, которые были объединены в единую библиотеку для проведения функциональных исследований.

Анализ представленности генов АМП из панели

Количество полученных клонов дрожжей на три порядка превышает количество вариантов анализируемых генов АМП, что свидетельствует о достаточной представительности данной библиотеки. Для проверки наличия всех генов АМП из панели и их соотношения мы выделили тотальную геномную ДНК и провели NGS-анализ. Согласно данным секвенирования, в библиотеке присутствуют все гены АМП из панели (рис. 3).

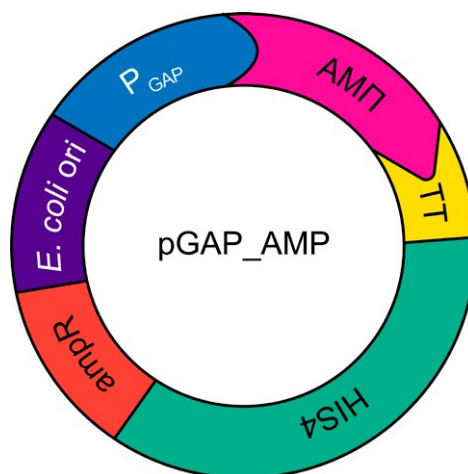


Рис. 2. Схема генетической конструкции для конститутивной продукции АМП

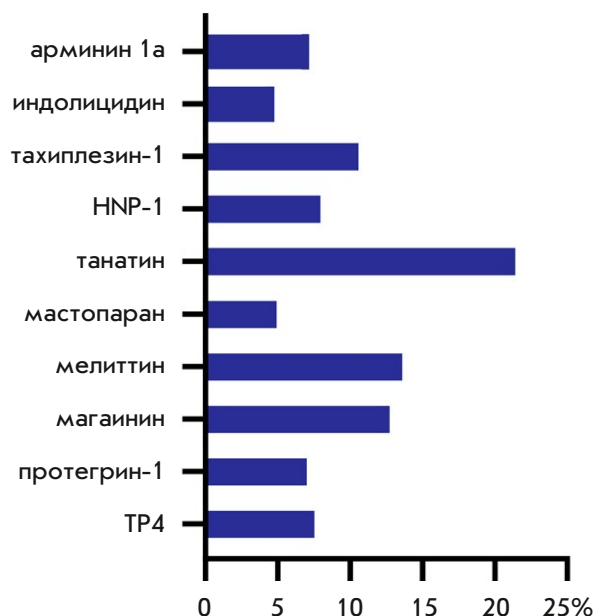


Рис. 3. Анализ представленности генов АМП в дрожжевой библиотеке. По оси абсцисс отложены доли (%) от общего количества последовательностей

Анализ антимикробной активности дрожжевой библиотеки продуцентов АМП

Антимикробную активность проверяли путем анализа образования зон ингибирования роста бактерии-мишени *E. coli* Δ lptD на питательной среде в чашках Петри (рис. 4).

Количество проанализированных клонов составило ~ 3000, что более чем на два порядка покрывает исследуемую библиотеку АМП. Таким образом, вероятность потери клона, несущего ген какого-либо из выбранных АМП, в связи с недостаточным количеством проанализированных клонов была сведена к минимуму. Из 55 клонов выделили геномную ДНК. Участок, содержащий ген АМП, амплифицировали и проанализировали с помощью секвенирования по Сэнгеру. В ходе анализа установлено, что 37 клонов содержали ген танатина, а 18 – протегрина-1.

Активные клоны дрожжей демонстрировали крупные зоны ингибирования роста таргетной бактерии, которые потенциально могли перекрываться с зонами от других пептидов. Чтобы исключить возможные потери активных клонов, мы дополнительно клонировали новый пул генов АМП, из которого были исключены гены протегрина-1 и танатина. Анализ активности клонов в уменьшенной библиотеке не выявил новых активных кандидатов.

Уровень продукции АМП активными клонами проанализирован также по интенсивности полос в полиакриламидном геле (рис. 5).

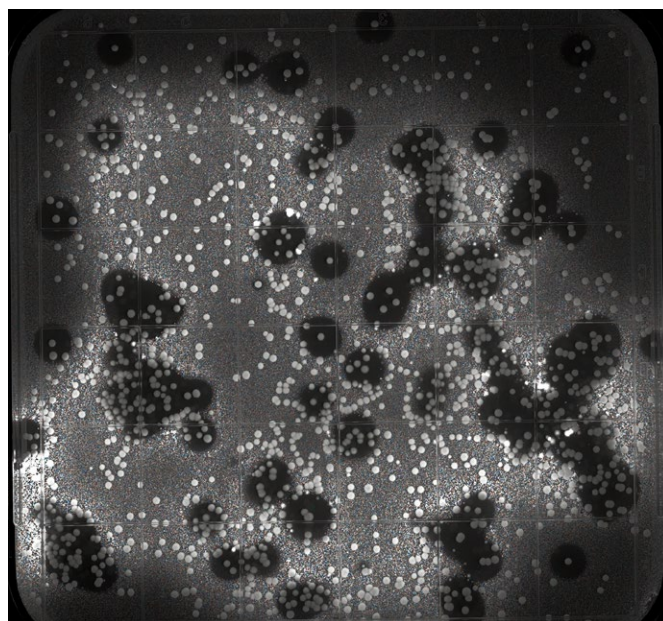


Рис. 4. Анализ образования зон ингибирования роста таргетной бактерии *Escherichia coli* Δ lptD клонами дрожжей, трансформированных pGAP_AMP

Образцы культуральной среды характеризовались высоким уровнем продукции рекомбинантного танатина, что видно по наличию четкой полосы в низкомолекулярной области электрофореграммы. В то же время отсутствие соответствующих полос в культуральных средах от продуцентов протегрина-1 указывало на низкий уровень продукции этого пептида. Однако рекомбинантные дрожжевые клоны-продуценты, несмотря на низкий уровень продукции протегрина-1, демонстрировали детектируемый уровень антимикробной активности, поскольку сам этот АМП обладает значительной антимикробной активностью.

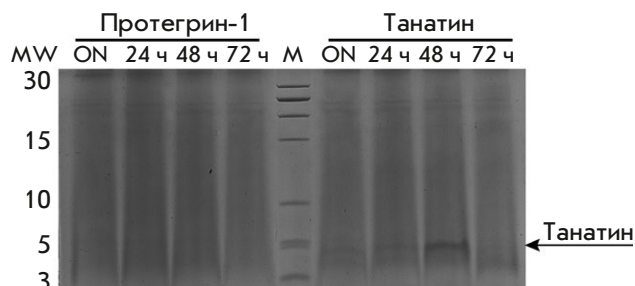


Рис. 5. Электрофореграмма проб культуральных сред продуцентов АМП в трициновом ПААГ. Отмечены временные точки отбора культуральной среды после культивирования клонов-продуцентов протегрина-1 и танатина. ON – среда после культивирования в течение ночи, М – маркер молекулярных масс белков

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в данной системе можно детектировать АМП как за счет высокой продукции, так и по уровню антимикробной активности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) широко распространены в природе в качестве защитных и сигнальных молекул [25]. В основном они состоят из 5–50 аминокислотных остатков, зачастую с преобладанием положительно заряженных и гидрофобных боковых цепей. Большая группа АМП не имеет специфической белковой мишени в бактериальных клетках, поскольку действует на мембрану или вызывает окислительный стресс, что затрудняет выработку бактериями устойчивости к АМП [26]. Известно также, что резистентные к антибиотикам бактерии могут проявлять повышенную чувствительность к АМП [27]. Таким образом, АМП являются перспективными кандидатами на роль альтернативных антимикробных соединений для борьбы с множественной лекарственной устойчивостью.

Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* являются удобным и экономичным гетерологическим продуцентом, поскольку для них доступен обширный набор генно-инженерных инструментов для продукции широкого спектра белковых молекул, а также за счет низкой себестоимости необходимых компонентов сред. Детекция антимикробной активности в гетерологическом продуценте способствует значительному сокращению затрат на синтез и первичный анализ активности АМП. В данной работе получена библиотека дрожжевых клонов, продуцирующих панель антимикробных пептидов. Одновременный анализ активности дрожжевых клонов позволил сравнить потенциальную токсичность выбранных пептидов в отношении эукариотических клеток и их удельную активность. Показана выраженная антимикробная активность клонов-продуцентов протегрина-1 и танатина.

Известно, что протегрин-1 обладает высокой гемолитической активностью и цитотоксичностью [28], тогда как танатин, действие которого направлено на бактериальные мишени, не вызывает выраженного гемолиза [29] и проявляет низкую токсичность в клетках млекопитающих [30]. Это может быть одной из причин наблюдаемых в нашей работе различий в уровне продукции данных АМП. Штаммы-продуценты остальных пептидов из панели не проявили выраженного антимикробного эффекта по отношению к целевой бактерии. Причиной подобного может быть потенциальная фунгицидная активность соответствующих АМП по отношению

к клеткам дрожжей *P. pastoris*. С другой стороны, дрожжи относятся к домену эукариоты, соответственно, АМП, действующие на эукариотические мембраны за счет неспецифического механизма действия будут токсичными для клеток дрожжей. Это, в свою очередь, может снизить уровни продукции и, как следствие, привести к отсутствию антимикробной активности у дрожжевого продуцента. Однако подобный эффект можно использовать для исключения АМП, которые обладают низкой селективностью по отношению к бактериальным мембранам и будут токсичными для эукариотических клеток. Потенциально токсичные варианты должны обладать высокой удельной активностью для успешной детекции в рамках подобного скрининга.

Таким образом, можно заключить, что скрининг активных вариантов АМП посредством рекомбинантной продукции в дрожжевых клетках позволяет отбирать пептиды с разными характеристиками. Подобная система может применяться для поиска новых матриц для создания искусственного разнообразия вариантов АМП и последующего улучшения их фармакокинетических свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования составлена панель АМП для создания пула рекомбинантных продуцентов. Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* были генетически модифицированы для секретируемой продукции антимикробных пептидов. Анализ зон ингибирования роста клонов дрожжей показал, что наиболее выраженной активностью обладают продуценты пептидов протегрина-1 и танатина. Анализ уровня продукции протегрина-1 и танатина показал более высокое содержание танатина в культуральной среде по сравнению с протегрином-1, что свидетельствует о разных причинах проявления высокой активности дрожжевых клонов. В случае танатина – за счет высокого уровня продукции, в случае протегрина-1 – за счет высокой удельной активности. Таким образом, использование дрожжевых клеток в качестве продуцентов АМП и создание на их основе пула клеток, обладающих антимикробной активностью, позволяет одновременно анализировать антимикробные свойства веществ в одинаковых условиях, сокращая время и затраты на проведение подобных исследований. Показан потенциал рекомбинантных технологий в разработке методов широкомасштабных скрининговых исследований антимикробных соединений. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-14-00357).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Robles Aguilar G., Gray A., Han C., Bisignano C., Rao P., Wool E., et al. // *The Lancet*. 2022. V. 399. № 10325. P. 629–655.
2. Cherny S.S., Nevo D., Baraz A., Baruch S., Lewin-Epstein O., Stein G.Y., Obolski U. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2021. V. 76. № 1. P. 239–248.
3. Nichol D., Rutter J., Bryant C., Hujer A.M., Lek S., Adams M.D., Jeavons P., Anderson A.R.A., Bonomo R.A., Scott J.G. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 334.
4. Itoh H., Tokumoto K., Kaji T., Paudel A., Panthee S., Hamamoto H., Sekimizu K., Inoue M. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2992.
5. Li S., She P., Zhou L., Zeng X., Xu L., Liu Y., Chen L., Wu Y. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 591426.
6. Lewis K. // *Cell*. 2020. V. 181. № 1. P. 29–45.
7. 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., Rubtsova M.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.
8. Magana M., Pushpanathan M., Santos A.L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A., Giulianotti M.A., Apidianakis Y., Bradfute S., Ferguson A.L., et al. // *Lancet Infect. Dis.* 2020. V. 20. № 9. P. e216–e230.
9. Barreto-Santamaría A., Arévalo-Pinzón G., Patarroyo M.A., Patarroyo M.E. // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 12. P. 1499.
10. Porto W.F., Pires A.S., Franco O.L. // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. № 3. P. 337–349.
11. Jhong J.-H., Yao L., Pang Y., Li Z., Chung C.-R., Wang R., Li S., Li W., Luo M., Ma R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D460–D470.
12. Ma Y., Guo Z., Xia B., Zhang Y., Liu X., Yu Y., Tang N., Tong X., Wang M., Ye X., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. № 6. P. 921–931.
13. Mourtada R., Herce H.D., Yin D.J., Moroco J.A., Wales T.E., Engen J.R., Walensky L.D. // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 10. P. 1186–1197.
14. Kim H., Jang J.H., Kim S.C., Cho J.H. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 185. P. 111814.
15. Chun J., Bai J., Ryu S. // *ACS Synth. Biol.* 2020. V. 9. № 3. P. 508–516.
16. Kazmirchuk T.D.D., Bradbury-Jost C., Withey T.A., Gesse T., Azad T., Samanfar B., Dehne F., Golshani A. // *Genes*. 2023. V. 14. № 6. P. 1194.
17. Hollmann A., Martinez M., Maturana P., Semorile L.C., Maffia P.C. // *Front. Chem.* 2018. V. 6. P. 204.
18. Karbalaei M., Rezaee S.A., Farsiani H. // *J. Cell Physiol.* 2020. V. 235. № 9. P. 5867–5881.
19. Wu S., Letchworth G.J. // *Biotechniques*. 2004. V. 36. № 1. P. 152–154.
20. Schägger H. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 1. P. 16–22.
21. Lööke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. // *BioTechniques*. 2011. V. 50. № 5. P. 325–328.
22. Terekhov S.S., Eliseev I.E., Ovchinnikova L.A., Kabilov M.R., Prjibelski A.D., Tupikin A.E., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Severinov K.V., Lomakin Y.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 44. P. 27300–27306.
23. Wang G., Li X., Wang Z. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D1087–D1093.
24. Pirtskhalava M., Amstrong A.A., Grigolava M., Chubinidze M., Alimbarashvili E., Vishnepolsky B., Gabrielian A., Rosenthal A., Hurt D.E., Tartakovsky M. // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № D1. P. D288–D297.
25. Koczulla A.R., Bals R. // *Drugs*. 2003. V. 63. № 4. P. 389–406.
26. Bahar A.A., Ren D. // *Pharmaceuticals*. 2013. V. 6. № 12. P. 1543–1575.
27. Lázár V., Martins A., Spohn R., Daruka L., Grézel G., Fekete G., Számel M., Jangir P.K., Kintsés B., Csörgő B., et al. // *Nat. Microbiol.* 2018. V. 3. № 6. P. 718–731.
28. Edwards I.A., Elliott A.G., Kavanagh A.M., Zuegg J., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A. // *ACS Infect. Dis.* 2016. V. 2. № 6. P. 442–450.
29. Hou Z., Lu J., Fang C., Zhou Y., Bai H., Zhang X., Xue X., Chen Y., Luo X. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 203. № 2. P. 273–282.
30. Tanhaei A., Azghandi M., Mousavi Z., Javadmanesh A. // *Protein Pept. Lett.* 2020. V. 27. № 1. P. 41–47.