

Высокопроизводительный скрининг библиотеки из 20000 органических веществ на их антибиотическую активность (High-throughput screening of 20000 chemical compounds for their antibiotic activity)

Хвель Ирина Максимовна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: partyhardim@gmail.com

Поиск новых антибиотиков не перестаёт быть актуальной проблемой сегодня. Обычно антибиотики ищут среди природных антибактериальных соединений, и ранее задача поиска потенциальных антибиотиков в библиотеке искусственно синтезированных органических веществ не ставилась. Поэтому мы решили проанализировать библиотеку из 20000 органических веществ на предмет их антибактериальной активности с помощью методики, которая позволяет не только выявить ингибирование роста бактерий, но и сделать выводы о механизме действия потенциальных антибиотиков.

Метод основан на использовании репортера — плазмиды, экспрессирующей флуоресцентный белок в качестве реакции на определённый механизм действия антибиотика. За исходную была взята репортерная конструкция, отвечающая экспрессией CFP (голубого флуоресцентного белка) на ингибирование трансляции[1] и доказавшая свою эффективность при изучении механизма действия амикоуцина[2]. Первой задачей было создание методами генной инженерии двойной репортерной плазмиды, которая позволяла бы экспрессировать различные флуоресцентные белки в ответ на различные механизмы действия антибактериального вещества. В результате был создан репортёр, способный детектировать ингибирование трансляции и вызов SOS-ответа в клетках. Затем полученная репортерная плазида была трансфицирована в клетки *E. coli* штаммов WT и dtolC, скрининг всей библиотеки проводился параллельно для этих двух штаммов.

Задача скрининга была осложнена количеством анализируемых веществ, в связи с чем он проводился полуавтоматически с использованием 96-канальной автоматической пипетки JANUS. Вещества наносились на газон из бактериальных клеток, затем следовала инкубация, после которой мы могли наблюдать эффекты этих веществ на клетки:

- 1) Выраженная зона ингибирования с индуцированным трансляционным репортёром или репортёром на SOS-ответ в субингибиторной зоне. Индукция двух репортёров сразу происходила крайне редко.
- 2) Выраженная зона ингибирования без индукции репортёров в субингибиторной зоне.
- 3) Отсутствие антибактериальной активности у вещества.

Таким образом, при скрининге библиотеки 20000 органических соединений мы во многих случаях могли не только показать антибактериальную активность вещества, но и сразу сделать предположение о механизме его действия на бактериальную клетку. На данный момент мы решили сфокусироваться на новых рибосомных антибиотиках. Среди проанализированных веществ было найдено несколько десятков ингибиторов трансляции в бактериальной клетке, и на данный момент с ними проводятся эксперименты по *in vitro* трансляции и МТТ тесты для того, чтобы отсеять ложно положительные результаты репортёра и выявить токсичность веществ для эукариотических клеток, а также тесты на

выявление минимальных действующих концентраций веществ.

Источники и литература

- 1 Osterman I.A. et al "Attenuation-based Dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors Antimicrob Agents Chemother. 2012 Apr;56(4):1774-83
- 2 Polikanov Y.S. et al "Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome Mol Cell. 2014 Nov 20;56(4):531-40

Слова благодарности

Выражаю благодарность моему научному руководителю, Остерману Илье, за то, что он был достаточно терпелив, а также одному из его студентов, Диме Лукьянову с 4го курса химфака и аспирантке Екатерине Андреевской за помощь в проведении экспериментов.