

ОБЗОРЫ

УДК 577.181.3.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕПОРТЕРНЫХ ШТАММОВ ДЛЯ СКРИНИНГА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

**П.В. Сергеев^{1*}, И.А. Остерман¹, А.А. Головина¹, И.Г. Лаптев¹, Ф.И. Плетнев¹, С.А. Евфратов¹,
Е.И. Марусич², С.В. Леонов², Я.А. Иваненков², А.А. Богданов¹, О.А. Донцова¹**

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119992; тел.: (495)9395418; эл. почта: petya@genebee.msu.ru

²Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Московская область, 117303

Поиск новых антибиотиков остается актуальной задачей биологии и медицины. Необходимым этапом в исследовании новых антибиотиков является установление механизма их действия, причем желательно быстро и дешево, предпочтительно на этапе первичного скрининга. В представленном обзоре приведены сведения о применении репортерных штаммов для быстрой классификации антибиотиков по механизму действия, не требующей очистки и определения строения анализируемых соединений.

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

DOI: 10.18097/PBMC20166202117

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы регистрируется значительный рост устойчивости возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций к антимикробным препаратам. Антимикробная резистентность является естественным биологическим ответом на частое, повсеместное использование лекарственных средств, способствующим отбору, выживанию и размножению устойчивых штаммов микроорганизмов [1, 2]. Устойчивость приобретает путём горизонтального переноса генов или в результате возникновения мутаций. Появление резистентных патогенов вызывает всё большее беспокойство, так как смертность от лекарственно-устойчивых бактериальных инфекций ежегодно возрастает. Например, по этой причине только в Соединенных Штатах Америки каждый год умирают 23000 граждан, а нагрузка на систему здравоохранения, обусловленная этими заболеваниями, оценивается в 20 млрд. \$ в год. В Европейском союзе устойчивость к антибиотикам уносит 25000 жизней при дополнительных затратах 0,9 млрд. Евро [3]. В Российской Федерации устойчивость бактериальных патогенов к антибиотикам также причиняет существенный ущерб. В таких условиях экспресс-поиск новых антибиотиков и определение механизма их действия крайне актуальны. В настоящее время поиск новых антибиотиков начинается с анализа антибактериальной активности. Если такую активность находят, то антибиотик стараются выделить в чистом виде, определить его строение и механизм действия. Установление механизма действия абсолютно необходимо для продвижения потенциального лекарственного средства на фармацевтический рынок [4].

1. РЕПОРТЕРНЫЕ ГЕНЫ

Применение репортерных штаммов для отнесения исследуемого антибиотика к определенному классу по структуре или механизму действия основано на селективном увеличении экспрессии какого-либо гена под воздействием сублетальных концентраций антибиотика. В природе существует множество подобных систем, позволяющих бактериальной клетке активировать гены, продукты которых либо предотвращают действие антибиотика, либо способны смягчать последствия действия антибактериального соединения. Регуляторные системы такого рода могут использоваться при создании сенсоров для антибиотиков с определённым механизмом действия. При этом, конечно, сам продукт активируемого гена должен быть заменен на репортерный ген, экспрессию которого можно легко визуализировать.

В качестве репортерных генов используют несколько генов, самым первым и самым известным из которых был ген *lacZ*, кодирующий фермент бета-галактозидазу, которая гидролизует дисахарид лактозу на два моносахарида – галактозу и глюкозу. Оба природных продукта реакции не окрашены и не могут легко детектироваться визуально. Для выявления бета-галактозидазной активности используют так называемые хромогенные субстраты, например X-gal, 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид [5].

X-gal – бесцветное вещество, которое превращается бета-галактозидазой в окрашенное вещество – 5,5'-дibromo-4,4'-дихлороиндиго (рис. 1); его синюю окраску можно наблюдать на твердой агаровой среде с X-gal при действии бактерий, экспрессирующих ген *lacZ*.

* - адресат для переписки

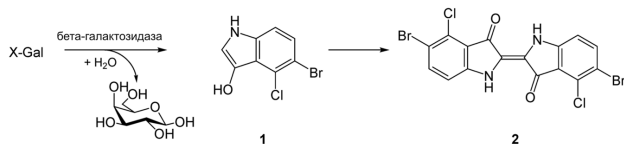


Рисунок 1. Расщепление 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозида, X-gal, бета-галактозидозой с образованием 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго.

Действие антибиотиков, особенно ингибирующих биосинтез белка, приводит к подавлению синтеза всех белков в клетках бактерий, в том числе, и любых репортерных белков. На фоне общего подавления биосинтеза белков индукция любой репортерной системы экспрессии может быть маскирована. Если при этом использовать дополнительный белок, экспрессия которого не регулируется, качестве контроля можно будет следить за соотношением экспрессии генов репортерных белков. Тогда, даже при общем падении биосинтеза всех белков, относительное количество репортерного и контрольного белка будет надежным индикатором индукции репортерной системы.

Хорошо известна репортерная система состоящая из двух белков – люцифераз из светлячка (firefly) и из коралла (genilla) (см. например [6]). Количество соответствующих белков Fluc и Rluc в клетке определяют по их ферментативной активности. Под действием этого фермента субстрат люциферазы светлячка, люциферин, превращается в присутствии АТФ и кислорода в оксилуциферин (рис. 2). При этой реакции выделяется квант света, который можно детектировать при помощи люминометра. Люцифераза коралла Rluc активна в отношении другого субстрата – козлентеразина (рис. 3). Перекрестной активности люцифераз не наблюдается.

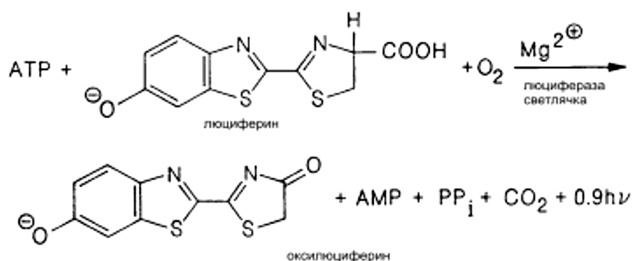


Рисунок 2. Ферментативная реакция, катализируемая люциферазой светлячка.

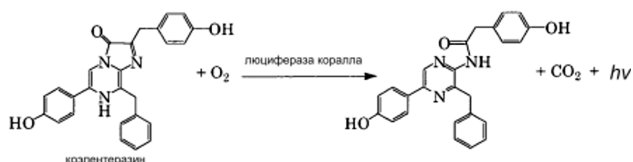


Рисунок 3. Ферментативная реакция, катализируемая люциферазой коралла.

Известны два основных недостатка использования люцифераз в качестве репортерных генов. Во-первых, это необходимость приготовления клеточных экстрактов для детекции ферментативной активности и постановки эксперимента по определению

активности с использованием дополнительных шагов пипетирования. Смешивать компоненты реакции необходимо исключительно в пробирках или лунках планшета. Для выявления люциферазной активности недостаточно просто слоя бактерий. Во-вторых, субстраты люцифераз светлячка и коралла достаточно дороги.

Существуют варианты использования гена люциферазы в качестве репортерного без вносимого отдельного субстрата. При этом бактерия должна иметь возможность сама синтезировать необходимый субстрат. В данном случае в бактерию вводят не отдельный ген люциферазы, а полный lux-оперон люминесцирующих бактерий [7]. Среди природных люминесцирующих бактерий наиболее известны морские бактерии *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* и наземная *Photobacterium luminescens*. Как правило, эти бактерии являются симбионтами или паразитами более крупного организма-хозяина [8, 9]. В качестве репортерного используют целый оперон этих бактерий (рис. 4).

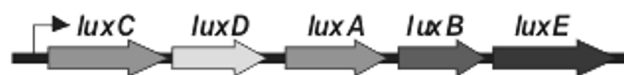


Рисунок 4. *lux*-оперон люминесцентных бактерий.

Ферментативная активность бактериальных люцифераз отличается от активности люцифераз многоклеточных. Димер LuxAB окисляет алифатический альдегид кислородом, используя при этом флавинаденинмононуклеотид (рис. 5). Кроме генов люцифераз в качестве репортерных используют гены флуоресцентных белков. Самый известный и наиболее часто используемый среди них – ген зелёного флуоресцентного белка [10]. Флуоресцентные белки не требуют субстратов, их появление в клетке можно легко визуализировать даже на агаровой чашке без специальных измерительных приборов. Флуорофор образуется из аминокислотных остатков самого белка при окислении кислородом (рис. 6).

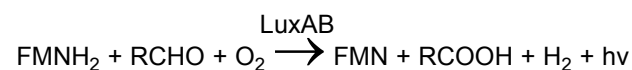


Рисунок 5. Ферментативная реакция, катализируемая бактериальными люциферазами.

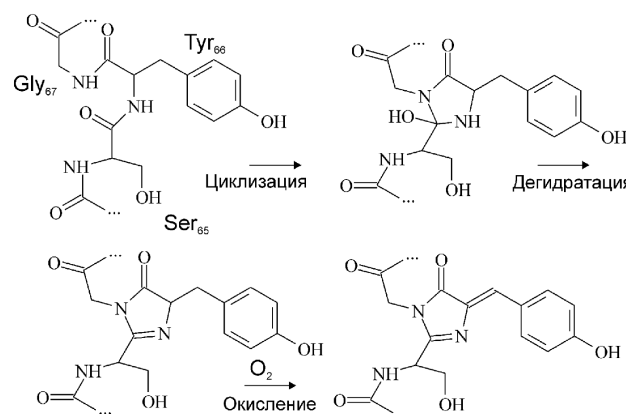


Рисунок 6. Созревание флуорофора GFP.

Флуоресцентные белки очень удобны в применении, так как не требуют дополнительных реагентов и приборов для визуализации. Тем не менее, использование только одного флуоресцентного белка в качестве репортерного нерационально. Большое разнообразие природных и искусственных флуоресцентных белков с разными спектральными характеристиками позволяет создавать репортерные конструкции с внутренним контролем, подобные двойной люциферазной системе.

2. ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БАКТЕРИИ В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКА КАК ИСТОЧНИК СОЗДАНИЯ РЕПОРТЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Воздействие антибиотиков каждого класса меняет транскрипционный и протеомный профиль бактерии уникальным образом. Зная гены, экспрессия которых возрастает при воздействии антибиотиков того или иного класса, можно создать репортерную систему, отвечающую на антимикробные соединения данного класса. В настоящий момент используется достаточно много репортерных систем, позволяющих обнаруживать известные классы антибиотиков. Обычно ген репортерного белка находится под контролем промотора, активируемого соответствующим антибиотиком. Такие системы встречаются перед генами устойчивости к специфическим классам антибактериальных веществ. Так, тетрациклины выявляют при помощи специфического репрессора мобильного элемента Tn10 [11]. Этот транспозон кодирует ген устойчивости к тетрациклину и регуляторный ген *tetR*, кодирующий репрессор транскрипции. При взаимодействии репрессора с тетрациклином TetR перестаёт связывать промоторную область, и в результате активируется экспрессия гена устойчивости. Промотор, регулируемый TetR, использовали вместе с репортерным геном люциферазы для создания штамма, способного обнаруживать тетрациклин и его производные [11, 12]. Сходным образом, используя гены *ampR/ampC* *Citrobacter freundii*, выявляют бета-лактамы антибиотики [12, 13]. Синтез бета-лактамазы AmpC *Citrobacter* находится под контролем репрессора AmpR. Репрессия снимается в присутствии антибиотиков пенициллинового ряда. Эту систему в сочетании с *lux*-опероном также использовали для создания репортерного штамма [13]. Описано использование данной системы и без дополнительного репортерного гена. Активность AmpC в этой работе детектировали с помощью специфического субстрата, нитроцефина [14]. Макролидные антибиотики можно обнаружить с помощью репрессора MphR из штамма *Escherichia coli* Tf481A [15]. Этот репрессор ингибирует транскрипцию гена устойчивости, кодирующего макролид-2'-фосфотрансферазу, до тех пор, пока не свяжет эритромицин и его аналоги [16].

Помимо специфических белков-репрессоров, узнающих антибиотики определенного класса, известны несколько регуляторных систем, основанных

на самом механизме действия антибиотиков. Так, способность эритромицина и других макролидов, а также хлорамфеникола останавливать продвижение рибосомы по мРНК, используется в природных сенсорах этих антибиотиков. Гены, кодирующие метилтрансферазы 23S рРНК, действие которых вызывает устойчивость к макролидам, часто находятся под контролем подобных систем аттенуации транскрипции [17]. При этом перед геном метилтрансферазы *ermC* находится ген лидерного пептида *ermCL*, гиперчувствительного к остановке трансляции эритромицином (рис. 7).

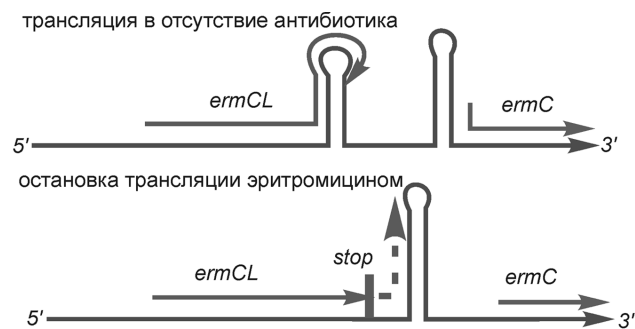


Рисунок 7. Схема регуляции экспрессии гена *ermC*, кодирующего метилтрансферазу, при остановке трансляции *ermCL* эритромицином.

В отсутствие антибиотика трансляция мРНК *ermCL* происходит быстро, а её вторичная структура препятствует эффективной трансляции мРНК метилтрансферазы *ermC*. При остановке трансляции вторичная структура разворачивается и эффективность трансляции *ermC* повышается. Эта природная система была использована для создания сенсора макролидных антибиотиков [18]. Сходная система индукции описана для генов устойчивости к хлорамфениколу [19].

Помимо специфических сенсоров на определённые классы антибактериальных соединений при создании репортерных штаммов используют промоторы, активирующиеся при определённых типах стресса, вызванных антибиотиками. Антибиотики, вызывающие повреждение ДНК, как фторхинолоны и митомицин C, активируют систему SOS-ответа. Несколько промоторов, находящихся под контролем данной системы, *recA*, *sulA*, *umuDC* и *cda*, использовали при создании сенсоров ДНК-повреждающих антибиотиков [12, 20-25]. Промотор гена *katG* использован для создания сенсора на окислительное повреждение клеток [21]. Повреждение клеточной стенки при действии полимиксина В и карбенициллина вызывает стрессовый ответ, который можно выявить с помощью репортера на основе промотора P3 *rpoH* гена [26]. Антибиотики сразу нескольких классов вызывают тепловой или холодный шок. Так, хлорамфеникол и тетрациклин активируют экспрессию гена холодного шока *cspA* [26], а стрептомицин и неомицин – гены теплового шока *ibpA* и *ibpB* [26].

Индукцируемые антибиотиками репортерные конструкции применяют не только для поиска

новых антибиотиков, в последнее время актуальным стало их использование для детекции следовых количеств антибиотиков в пищевых продуктах [27, 28]. С этой целью можно применять те же репортерные конструкции, что и для поиска новых антибиотиков. Еще одно перспективное направление, появившееся в последнее время, – детекция бактерий и действия на них антибиотиков в моделях природных систем патоген-хозяин. Пока эти исследования ограничены детекцией бактерий и наблюдением за их гибелью, вызванной антибиотиками [29, 30], но в дальнейшем, безусловно, возможным станет и наблюдение за индукцией стрессовых генов бактерии, вызванной антибиотиком, в сложных системах.

3. РЕПОРТЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Среди множества подходов к созданию репортерных конструкций для детекции антибиотиков можно выделить более и менее удачные. Какими свойствами должна обладать репортерная конструкция, которую можно применять для высокопроизводительного скрининга и классификации механизма действия антибактериальных препаратов?

Во-первых, необходимо определиться с репортерными генами. Среди известных репортерных генов предпочтение следует отдать тем, которые позволяют создавать двойные репортерные системы с внутренним контролем. Экспрессию генов подавляют антибиотики различных классов, например, ингибиторы транскрипции и трансляции. Какова бы ни была репортерная система, её экспрессия также по необходимости будет подавляться антибиотиками. Поэтому требуется внутренний стандарт, относительно которого можно измерять индукцию экспрессии репортерного гена даже на фоне общего подавления экспрессии всех генов. В настоящий момент существуют две таких системы. Классическая система основана на генах люцифераз светлячка (Fluc) и коралла (Rluc). Основной недостаток этой системы – использование лизатов клеток и специфических и дорогостоящих субстратов. Это существенно усложняет анализ, замедляет его и делает весьма дорогим. Альтернативным представляется применение генов двух флуоресцентных белков. В нашей лаборатории создана [31] и успешно применяется [32, 33] система на основе генов флуоресцентных белков Red Fluorescence protein (RFP) (красный) [34] и Cerulean (CER) (голубой) [35]. Выбор именно этих белков был обусловлен тем, что их спектры поглощения и испускания практически не перекрывались между собой, поэтому уровни их экспрессии можно детектировать независимо. Значения длин волн на максимумах пиков (нм) возбуждения/испускания у CER составило 430/486, а RFP – 531/595.

Во-вторых, важно выбрать сенсорную систему. Специфические репрессоры, такие как описанные выше TetR, AmpR и MphR, способны эффективно

обнаруживать тетрациклины, бета-лактамы и макролидные антибиотики, но при этом они не могут обнаруживать антибиотики новых структурных классов, что является наиболее интересной задачей. Интересным примером может служить сенсорная система на основе генетически модифицированного аттенуатора триптофанового оперона, способная обнаруживать соединения различных структурных классов, замедляющих продвижение рибосомы по мРНК. В качестве системы, реагирующей на ингибиторы биосинтеза белка, мы использовали природную систему аттенуации, чувствительную к скорости перемещения рибосомы по мРНК. Классический пример аттенуации – терминация транскрипции при изменении вторичной структуры мРНК рибосомой. На этом основана регуляция экспрессии бактериальных оперонов, кодирующих белки метаболизма аминокислот: триптофанового, фенилаланинового, изолейцинового, гистидинового [36]. Как правило, в начале оперона расположен ген короткого лидерного пептида, несущий несколько кодонов той аминокислоты, белки биосинтеза которой кодируются опероном. Внутриклеточная концентрация аминокислоты отражается на количестве соответствующей аминоацилированной тРНК. В результате рибосома останавливается при трансляции лидерного пептида в зависимости от концентрации аминокислоты. Пауза в работе рибосомы приводит к образованию вторичной структуры, соответствующей антитерминатору транскрипции последующих генов оперона. Быстрое прочтение рибосомой лидерного пептида приводит к формированию терминатора транскрипции. Таким образом, если концентрация аминокислоты в клетке высока, то экспрессия генов биосинтеза данной аминокислоты подавляется. Рассмотрим аттенуацию более подробно на примере триптофанового оперона *E. coli* [37], структура которого показана на рисунке 8.

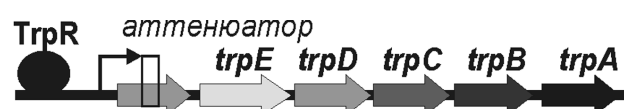


Рисунок 8. Структура *trp*-оперона *Escherichia coli* (www.ecocyc.com). Отмечены гены *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA* и *trpL* (лидерный пептид), а также три участка посадки репрессора транскрипции TrpR и промотор TrpLp.

Образование р-независимого терминатора перед первым цистроном *trpE* зависит от скорости трансляции рибосомой лидерного пептида TrpL (рис. 8). Этот пептид состоит из 14 аминокислотных остатков, из которых 10-й и 11-й – триптофан и 12-й – аргинин. Кодоны, кодирующие их, – одни из самых редких у *E. coli*, а кодон, кодирующий триптофан, к тому же единственный. Частота встречаемости кодонов коррелирует со скоростью встраивания соответствующих аминокислот в растущую полипептидную цепь белка. Так что сама последовательность UGGUGGCGC вызывает паузу в работе рибосомы. мРНК цистрона *trpL*

и межкистронная область *trpL-trpE* содержат четыре участка, способных образовать шпильки 1:2 и 3:4 (терминатор транскрипции) или шпильку 2:3 (антитерминатор транскрипции) (рис. 9). Согласно данным, полученным *in vitro*, рибосома покрывает 16 н. в сторону 3'-конца мРНК от кодона в А-участке. Тогда участок мРНК, закрываемый рибосомой при её остановке на первом UGG-кодоне, будет достигать аденозина 72, следующего после стоп-кодона UGA, и будет образовываться шпилька 2:3. Эта ситуация соответствует недостатку триптофана и индукции оперона. При избытке триптофана рибосома быстро доходит до стоп-кодона и препятствует формированию шпильки 2:3, вместо этого образуется шпилька 3:4 – терминатор транскрипции. Если рибосома успевает завершить транскрипцию и диссоциировать от мРНК до сворачивания шпильки 3:4, то эффективность терминации транскрипции зависит от относительной устойчивости двух вторичных структур мРНК.

Для того, чтобы сделать репортерную конструкцию независимой от концентрации триптофана, но реагирующей на антибиотики, останавливающие

трансляцию лидерного пептида, триптофановые кодоны заменили на аланиновые. При этом в лидерную область оперона внесли компенсаторные мутации, восстанавливающие вторичную структуру этой области. В полученной конструкции ген *RFP* использовали в качестве внутреннего стандарта, а ген *CER* находился под управлением генетически модифицированного аттенюатора триптофанового оперона. Созданная репортерная конструкция хорошо зарекомендовала себя в высокопроизводительном скрининге антибактериальных препаратов, останавливающих биосинтез белка. С её помощью обнаружен представитель нового класса соединений, действующих на рибосому, – амикумадин [33]. Оказалось, что это уникальное соединение останавливает рибосому особым образом – замедляя транслокацию, взаимодействуя с мРНК. Это не единственный пример удачного использования репортерных конструкций для поиска новых антибиотиков с немедленным, на этапе скрининга, определением их мишени. Использование репортера Amp^rC позволило найти два новых ингибитора построения клеточной стенки [14]. С помощью

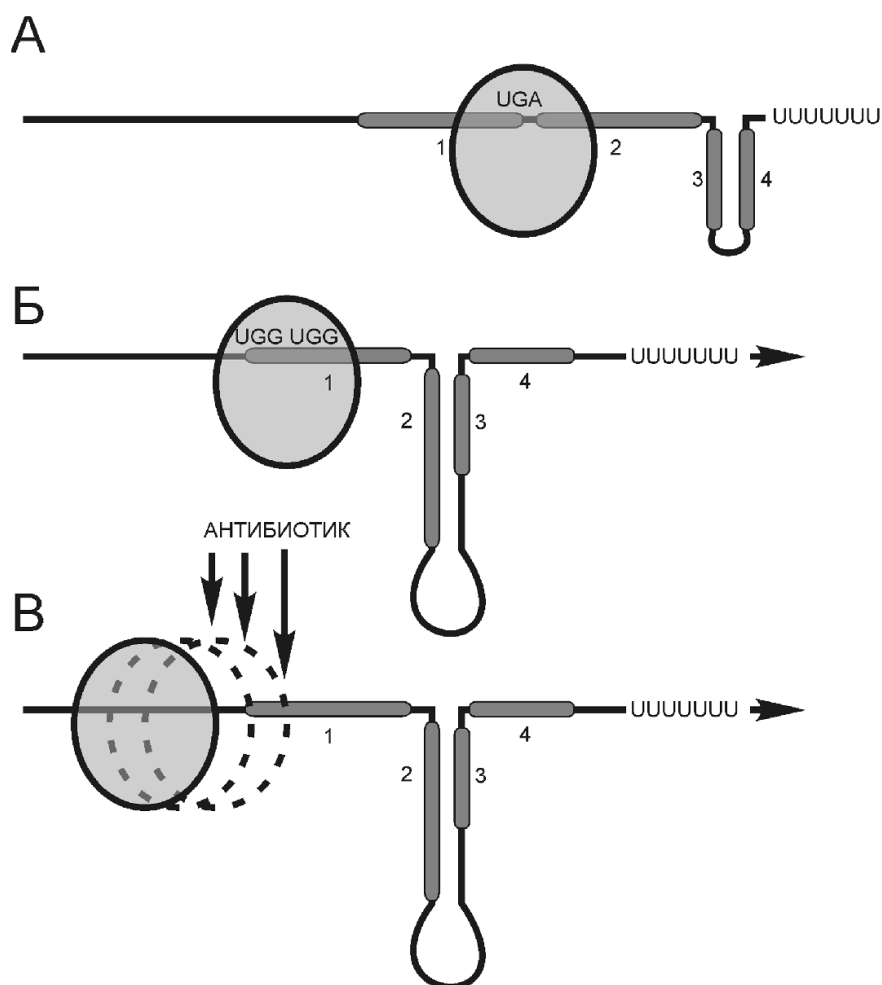


Рисунок 9. Аттенюация транскрипции триптофанового оперона и репортерной конструкции. (А) Вторичная структура мРНК лидерного пептида *trpL*, соответствующая терминатору (шпилька 3:4) в присутствии избытка триптофана, при быстром перемещении рибосомы по мРНК. (Б) Вторичная структура того же участка, соответствующая антитерминатору (шпилька 2:3). (В) Антитерминаторная шпилька, формирующаяся в аттенюаторной области репортерной конструкции при замедлении рибосомы антибиотиками.

гена *gfp*, активируемого промотором *resA* удалось найти новый ингибитор гиразы [25], а использование люциферазного оперона под контролем промотора гена *uwaC* [38] привело к выявлению девяти ингибиторов построения клеточной стенки грамположительных бактерий.

Перспективным развитием данной области может стать как использование высокопроизводительных, роботизированных методов скрининга с применением уже существующих репортерных штаммов, так и разработка новых сенсоров, способных классифицировать антибактериальные препараты по другим механизмам действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение номер 14.607.21.0086, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0086) и ЗАО "ИИХР".

ЛИТЕРАТУРА

1. Fowler T., Walker D., Davies S.C. (2014) *Ann. NY. Acad. Sci.*, **1323**, 1-10.
2. Andersson D.I., Hughes D. (2014) *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 465-478.
3. WHO. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. 2014; Available from: http://www.who.int/drugresistance/documents/AMR_report_Web_slide_set.pdf?ua=1
4. Editorial (2010) *Nat. Med.*, **16**, 347.
5. Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., Darooge M.A., Fisher B.E., Mauricio J., Klundt I. (1964) *J. Med. Chem.*, **7**, 574-575.
6. Kimura S., Suzuki T. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1341-1352.
7. Gahan C.G. (2012) *Curr. Gene. Ther.*, **12**, 12-19.
8. Visick K.L., Ruby E.G. (2006) *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**, 632-638.
9. Waterfield N.R., Ciche T., Clarke D. (2009) *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**, 557-574.
10. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. (1994) *Science*, **263**, 802-805.
11. Kurittu J., Karp M., Korpela M. (2000) *Luminescence*, **15**, 291-297.
12. Котова В.Ю., Рыженкова К.В., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. (2014) *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **50**, 112-117.
13. Valtonen S.J., Kurittu J.S., Karp M.T. (2002) *J. Biomol. Screen*, **7**, 127-134.
14. Nayar A.S., Dougherty T.J., Ferguson K.E., Granger B.A., McWilliams L., Stacey C., Leach L.J., Narita S., Tokuda H., Miller A.A. et al. (2015) *J. Bacteriol.*, **197**, 1726-1734.
15. Mohrle V., Stadler M., Eberz G. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 1117-1125.
16. Zheng J., Sagar V., Smolinsky A., Bourke C., LaRonde-LeBlanc N., Cropp T.A. (2009) *J. Mol. Biol.*, **387**, 1250-1260.
17. Weisblum B. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 797-805.
18. Bailey M., Chettiath T., Mankin A.S. (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 866-874.
19. Lovett P.S. (1996) *Gene*, **179**, 157-162.
20. Kostrzynska M., Leung K.T., Lee H., Trevors J.T. (2002) *J. Microbiol. Methods*, **48**, 43-51.
21. Mitchell R.J., Gu M.B. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 46-52.
22. Norman A., Hestbjerg Hansen L., Sorensen S.J. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2338-2346.
23. Shapiro E., Baneyx F. (2007) *J. Biotechnol.*, **132**, 487-493.
24. Shapiro E., Baneyx F. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2490-2497.
25. Fan J., de Jonge B.L., MacCormack K., Sriram S., McLaughlin R.E., Plant H., Preston M., Fleming P.R., Albert R., Foulk M. et al. (2014) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 7264-7272.
26. Bianchi A.A., Baneyx F. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5023-5027.
27. Cheng G., Dong X., Wang Y., Peng D., Wang X., Hao H., Xie S., Qu W., Liu Z., Yuan Z. (2014) *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 7899-7910.
28. Virolainen N., Karp M. (2014) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **145**, 153-185.
29. Larsson M.C., Lerm M., Angeby K., Nordvall M., Jureen P., Schon T. (2014) *J. Microbiol. Methods*, **106**, 146-150.
30. Claudi B., Sprote P., Chirkova A., Personnic N., Zankl J., Schurmann N., Schmidt A., Bumann D. (2014) *Cell*, **158**, 722-733.
31. 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. (2012) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 1774-1783.
32. Osterman I.A., Evfratov S.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. (2013) *Nucleic Acids Res.*, **41**, 474-486.
33. 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. (2014) *Mol. Cell*, **56**, 531-540.
34. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W. et al. (2007) *Nat. Methods*, **4**, 555-557.
35. Rizzo M.A., Springer G.H., Granada B., Piston D.W. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 445-449.
36. Henkin T.M., Yanofsky C. (2002) *Bioessays*, **24**, 700-707.
37. Zurawski G., Elseviers D., Stauffer G.V., Yanofsky C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5988-5992.
38. Czarny T.L., Perri A.L., French S., Brown E.D. (2014) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 3261-3269.

Поступила: 15. 06. 2015.
Принята к печати: 16. 09. 2015.

APPLICATION OF REPORTER STRAINS FOR NEW ANTIBIOTIC SCREENING

*P.V. Sergiev¹, I.A. Osterman¹, A.Ya. Golovina¹, I.G. Laptev¹, P.I. Pletnev¹, S.A. Evfratov¹, E.I. Marusich²,
S.V. Leonov², Ya.A. Ivanenkov², A.A. Bogdanov¹, O.A. Dontsova¹*

¹Department of Chemistry and Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495)9395418; e-mail: petya@genebee.msu.ru

²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudnyi, Moscow region, 117303 Russia

Screening for new antibiotics remains an important area of biology and medical science. Indispensable for this type of research is early identification of antibiotic mechanism of action. Preferentially, it should be studied quickly and cost-effectively, on the stage of primary screening. In this review we describe an application of reporter strains for rapid classification of antibiotics by its target, without prior purification of an active compound and determination of chemical structure.

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