

УДК 577.182.48

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСШИРЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО ПРОСТРАНСТВА ЛАНТИБИОТИКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ АНТИБИОТИКОВ

Обзор

© 2020 С.О. Пипия¹, С.С. Терехов^{1,2}, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, В.Д. Кнорре¹, И.В. Смирнов^{1,2*}, А.Г. Габибов^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 Москва, Россия; электронная почта: smirnov@ibch.ru

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

Поступила в редакцию 11.08.2020

После доработки 28.09.2020

Принята к публикации 07.10.2020

Открытие антибиотиков послужило одним из ключевых этапов развития человечества, многократно увеличившим выживаемость и повысившим продолжительность жизни миллионов людей по всему миру. Бесконтрольное применение антибиотиков привело к селекции резистентных штаммов бактерий, ставящих под угрозу эффективность современной антимикробной терапии, актуализируя тем самым проблему поиска новых антибиотиков. В течение долгого времени антимикробные пептиды (АМП) считались перспективными кандидатами на роль антибиотиков нового поколения. В то же время практическое применение АМП не нашло широкого применения ввиду спектра проблем с терапевтическими индексами, фармакокинетикой и фармакодинамикой этих соединений, зачастую предопределённой их пептидной природой. Тем не менее генетически кодируемая природа АМП позволяет создавать широкие репертуары искусственного биоразнообразия антибиотиков, открывая беспрецедентные возможности для направленной эволюции антибиотической активности. Лантибиотики представляют собой уникальный класс АМП, обладающих расширенным химическим пространством. Разнообразие посттрансляционных модификаций, механизмов действия на бактериальные мембраны и генетически кодируемая структура делают их удобной молекулярной матрицей для создания высокопредставительных библиотек антимикробных соединений. Поиск новых лекарственных кандидатов среди представителей этого синтетического биоразнообразия чрезвычайно привлекателен, однако требует проведения широкомасштабного высокопроизводительного скрининга антибиотической активности. Комбинация методов синтетической биологии и ультра-высокопроизводительных микрофлюидных платформ позволяет реализовать концепцию направленной эволюции лантибиотиков для быстрого и эффективного создания новых перспективных лекарственных кандидатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: направленная эволюция антимикробной активности, генетически кодируемые антибиотики, ультра-высокопроизводительный скрининг, микрофлюидика, биоинженерия лантибиотиков, открытие лекарственных препаратов, антибиотикорезистентность.

DOI: 10.31857/S0320972520110044

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики десятилетиями служат на благо человечества, спасая миллионы жизней от смертельных инфекций. После открытия пени-

Принятые сокращения: АМП – антимикробные пептиды; Dha – дегидроаланин; Dhb – дегидробутирин; домен UEV – убиквитин-связывающий домен (ubiquitin E2 variant); PE – фосфатидилэтаноламин; РПП – рибосомально синтезированные и посттрансляционно-модифицируемые пептиды.

* Адресат для корреспонденции.

цилина наступила так называемая «Золотая эра антибиотиков». В период с 1928 по 1980 г. было открыто более 10 классов антибиотиков [1]. Однако в настоящее время из-за их бесконтрольного применения в сельском хозяйстве, а также неправильного и чрезмерного их использования в медицине человечество столкнулось с серьёзной угрозой, вызванной широкомасштабным возникновением устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам. Как сообщает Всемирная организация здравоохранения, человечество стоит на пороге постантибио-

тической эры [2]. Этот сценарий осложняется и появлением мультирезистентных штаммов, которые более не восприимчивы сразу к нескольким классам антибиотиков. Самыми распространёнными в клинической практике являются метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA), устойчивый к ванкомицину *Staphylococcus aureus* (VRSA) и ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE). Они представляют основную причину серьёзных инфекций, приобретённых в больнице. Помимо этого, клостридиальные инфекции являются часто встречающейся причиной больничной диареи. В последнее время число заражённых, а также смертность растут, и необходимо находить новые способы лечения [3]. Таким образом, научное и медицинское сообщество подчёркивает приоритетную роль исследований, ведущих к созданию альтернативных антимикробных препаратов.

В настоящее время разрабатывается целый ряд подходов для поиска новых антибиотиков. Технологии синтетической биологии и методы рационального дизайна позволяют создавать соединения с улучшенными антимикробными свойствами и характеристиками стабильности [4]. Развитие биоинформатических методов и расширение геномных баз данных позволили использовать технологии геномного майнинга для поиска новых кластеров биосинтеза антимикробных соединений [5]. Технологии высокопроизводительного скрининга находят активное применение в области поиска природных антибиотиков среди экзотических микробных сообществ [6]. Применение искусственного интеллекта для виртуального скрининга библиотек химических соединений на способность проявлять значительную антимикробную активность также показывает многообещающие результаты в данной области [7].

Для разработки новых соединений, применимых в клинической практике, важными критериями являются безопасность и эффективность. Пептиды являются перспективными кандидатами на роль модельных объектов для создания новых препаратов. Они обладают высокой селективностью и эффективностью взаимодействия с мишенями, их метаболизм в организме легко предугадать, развивающиеся технологии пептидного синтеза и биотехнологии позволяют снижать затраты на производство [8]. К настоящему моменту более 60 препаратов пептидной природы были выпущены на рынок и успешно применяются для лечения диабета, рака и орфанных заболеваний [9].

Пептиды также представляют интерес в области разработки антимикробных препаратов.

Однако, несмотря на множественные попытки создания терапевтических препаратов, антимикробные пептиды (АМП) не нашли широкого применения на практике. Это обуславливается рядом трудностей, зачастую связанных с их низкой селективностью [10]. Естественный уровень продукции АМП довольно низок, их химический синтез часто сопряжён с техническими трудностями и большими финансовыми вложениями [11]. Одним из наиболее серьёзных недостатков АМП является их подверженность протеолитической деградации, кардинальным образом ухудшающей их фармакокинетические характеристики. Тем не менее среди АМП есть перспективные классы, для которых, используя инструменты направленной эволюции и широкомасштабного скрининга, возможно создание молекул с подходящими для клинического применения свойствами.

Много внимания в настоящее время приковано к рибосомально синтезированным и посттрансляционно-модифицируемым пептидам (RiPPs или РПП). Биосинтез РПП начинается с образования пептида прекурсора. Он состоит из лидерной последовательности, которую узнают модифицирующие ферменты, и структурной последовательности, которая претерпевает последующие модификации. Последним этапом является процессинг лидерной последовательности протеазами и экспорт зрелого РПП во внеклеточную среду [12].

Генетически кодируемая последовательность таких пептидов позволяет легко вводить изменения в их структуру [13]. Большой набор возможных модификаций потенциально создаёт широчайший спектр генерируемых структур и функциональных групп, соединённых в одной молекуле, которая, в свою очередь, может продуцироваться рекомбинантными организмами. Таким образом, РПП обладают уникальными преимуществами для создания соединений с различной биологической активностью, что также позволяет улучшать стабильность этих молекул [14], делая их привлекательными объектами для терапевтического применения [15, 16].

Немалый интерес к данной области подкрепляется развитием технологий полногеномного секвенирования и метагеномного майнинга, благодаря которым увеличивается количество идентифицированных кластеров генов, потенциально отвечающих за биосинтез РПП [17, 18]. Известно примерно 20 семейств РПП, каждое из которых имеет свои особенности структуры, биосинтеза пептидов и биологической активности [19]. К ним относятся лантипептиды, цианобактины, ботрамицины, лассо-пептиды, микровиридины и другие.

ЛАНТИПЕПТИДЫ И ЛАНТИБИОТИКИ

Лантипептиды – группа рибосомально синтезированных и посттрансляционно-модифицированных пептидов, продуцируемых грамположительными бактериями [20]. Они имеют в своём составе остатки неканонических аминокислот лантионина и метил-лантионина, которые образуют внутримолекулярные тиоэфирные связи (рис. 1, а), и ряд других модификаций, таких как дегидратирование остатков Thr или Ser с образованием остатков дегидробутирина (Dhb) и дегидроаланина (Dha), *N*-концевое ацилирование и др. Лантипептиды закодированы в геноме продуцента в виде препептида, состоящего из лидерной последовательности и структурного пептида. Лидерная последовательность распознаётся ферментами модификации и направляет созревание лантипептида. Структурный пептид подвергается модификациям и после отрезания лидерной последовательности становится активной молекулой (рис. 1, б). Известно, что лантипептиды могут играть роль сигнальных или регуляторных молекул [21, 22], однако наибольший интерес среди них вызывают так называемые лантибиотики – лантипептиды, обладающие антимикробной активностью.

Гены, кодирующие ферменты биосинтеза лантипептидов, часто идентифицируют в виде кластеров на хромосомах, мобильных элементах или плазидах грамположительных бактерий. Согласно принятым обозначениям [23], ген, кодирующий структурный пептид, обозначается

как *lanA*, ферменты, осуществляющие основные модификации – *lanB* и *lanC* или *lanM*, *lanL* (для мультифункциональных ферментов лантибиотиков 2 и 4 класса), *lanT* – для белка-транспортера, *lanP* – для специфической протеазы, процессирующей лидерную последовательность, для дополнительных модифицирующих ферментов предусмотрены свои обозначения. *Lan* в названии гена или его продукта заменяется на соответствующее сокращение, принятое для конкретного лантибиотика.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛАНТИБИОТИКОВ

Современная система классификации лантибиотиков основана на различии в строении ферментов, осуществляющих дегидратацию и циклизацию структурного пептида, и механизмах внесения данных модификаций [19]. На сегодняшний день выделяют 4 основных класса лантипептидов (рис. 2).

Класс I. К данному классу относятся лантибиотики, для которых основные модификации вносят два отдельных фермента: LanB, который осуществляет дегидратацию, и LanC, обеспечивающий циклизацию и образование остатков лантионина и метиллантионина. Также в кластер биосинтеза входят специфические протеазы, ABC-транспортеры, ферменты, вносящие дополнительные модификации, регуляторные элементы и белки, обеспечивающие собственный иммунитет продуцента к лантибиотику. Генетические исследования показали, что гены клас-

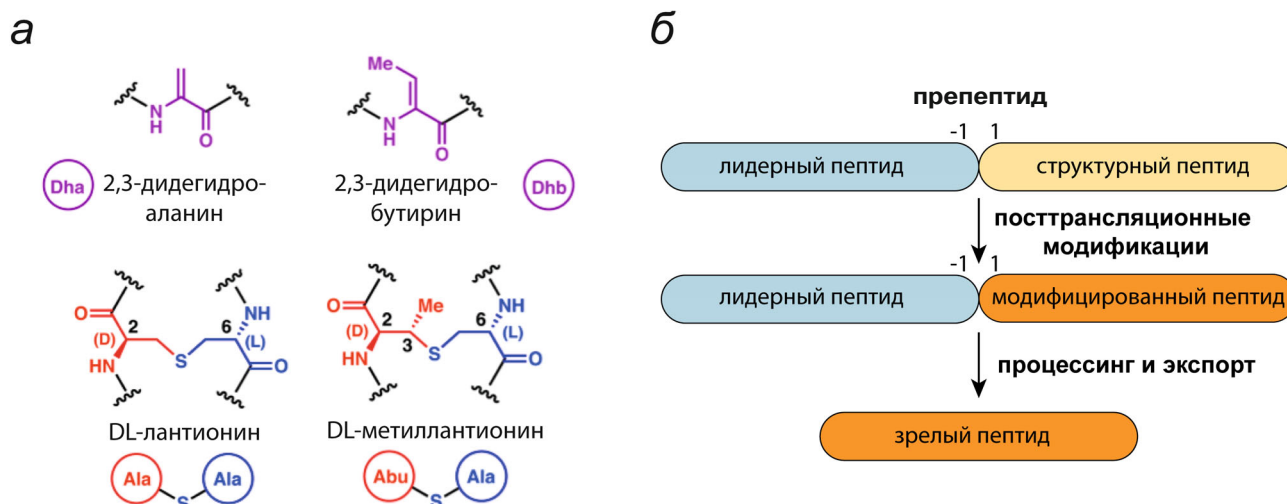


Рис. 1. а – Структура дегидратированных аминокислотных остатков и тиоэфирных кросс-сшивок, характерных для лантипептидов. б – Общая схема биосинтеза лантипептидов; адаптировано из [20]; Dha – дегидроаланин, Dhb – дегидробутирин, Abu – альфа-аминомасляная кислота. (С цветными вариантами рис. 1–8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

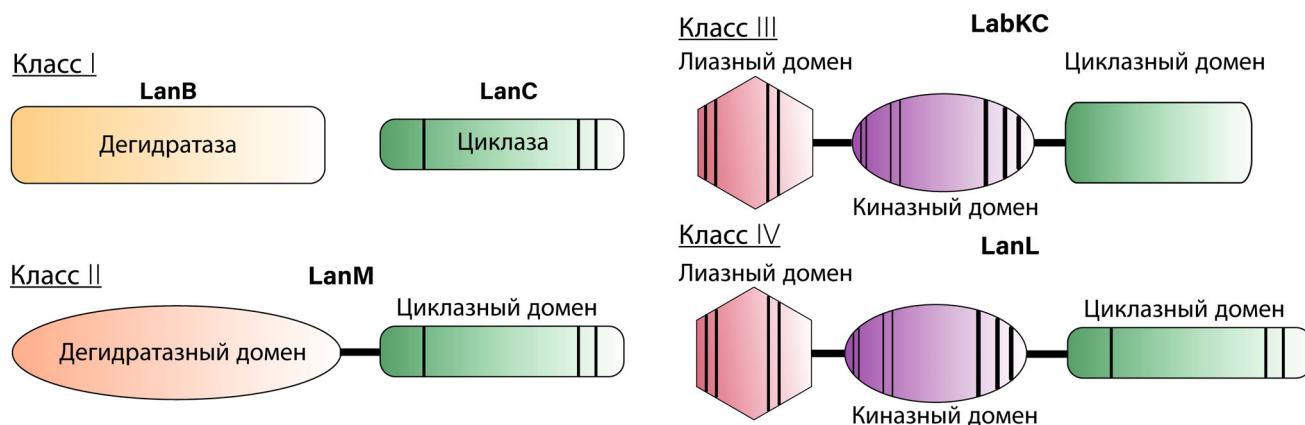


Рис. 2. Схематическое представление ферментов биосинтеза лантибиотиков. Вертикальные полосы обозначают консервативные участки, необходимые для каталитической активности, ширина полос схематически иллюстрирует относительный размер консервативного участка

тера биосинтеза класса I лантибиотиков широко распространены среди бактерий, входящих в разнообразные отделы [24].

Также на основе сходства лидерной последовательности препептида, которая узнается системой модификации, лантипептиды данного класса подразделяются на подгруппы: низин-подобные, эпидермин-подобные и Per5-подобные лантипептиды.

Отличительной особенностью класса I лантибиотиков является механизм дегидратации структурного пептида. Его исследования в основном были сконцентрированы на примере низина, как наиболее изученного и значимого представителя класса. Однако, несмотря на успехи в получении гетерологической системы биосинтеза низина [25], долгое время исследователям не удавалось реконструировать этот процесс *in vitro*. Первые положительные результаты были продемонстрированы в работе Garg et al. [26], в которой добавление в реакционную смесь АТФ, MgCl₂ и клеточного лизата из *Escherichia coli* к NisB приводило к полноценной дегидратации препептида NisA. При анализе мутантных форм фермента было обнаружено образование глутаминированного промежуточного соединения, которое было способно превращаться в дегидратированный пептид без добавления вспомогательных компонентов. Окончательный механизм дегидратации, осуществляемый NisB, был раскрыт после определения роли источника остатков глутамата — глутамил-тРНК [27]. Таким образом, LanB активирует гидроксил на боковой группе Ser/Thr через присоединение остатка глутамата от глутамил-тРНК. Затем происходит направленная диссоциация α-протона активированной аминокислоты, приводящая к β-элиминированию глута-

мата с образованием дегидроаминокислоты (рис. 3, а).

Циклизация и формирование тиозфирного кольца осуществляются ферментом LanC. По своей структуре он является гомологом циклазного домена мультифункциональных ферментов LanM [28] и LanL [29] лантибиотиков классов II и IV соответственно. Сходство обусловлено наличием у этих групп ферментов цинк-связывающего домена, что может говорить о схожих механизмах циклизации.

Транспорт зрелого пептида осуществляется посредством специфических транспортеров LanT. Мембранная ассоциация, а также наличие двух АТФ-связывающих Уокер-мотивов говорит об их принадлежности к семейству ABC-транспортеров [30]. В процессе транспорта LanT распознают лидерную последовательность, в то время как структурный пептид может отличаться от природного [31]. Подобная лабильность позволяет использовать машинерию биосинтеза лантибиотиков для создания разнообразных биологически активных соединений с улучшенными свойствами *in vivo*. Процессинг лидерного пептида осуществляется субтилизин-подобной сериновой протеазой LanP. Она может быть закорена на мембране или локализована в цитоплазме. Однако не для всех протеаз до конца установлено, в какой момент происходит процессинг лидерной последовательности — до или после транспорта соответствующим LanT. Так, для NisP показана внеклеточная локализация, а протеолиз лидерной последовательности происходит уже после секреции препептида. Для эффективного узнавания субстрата и последующего протеолиза необходимо наличие хотя бы одного лантионина в структурной части препептида [32].

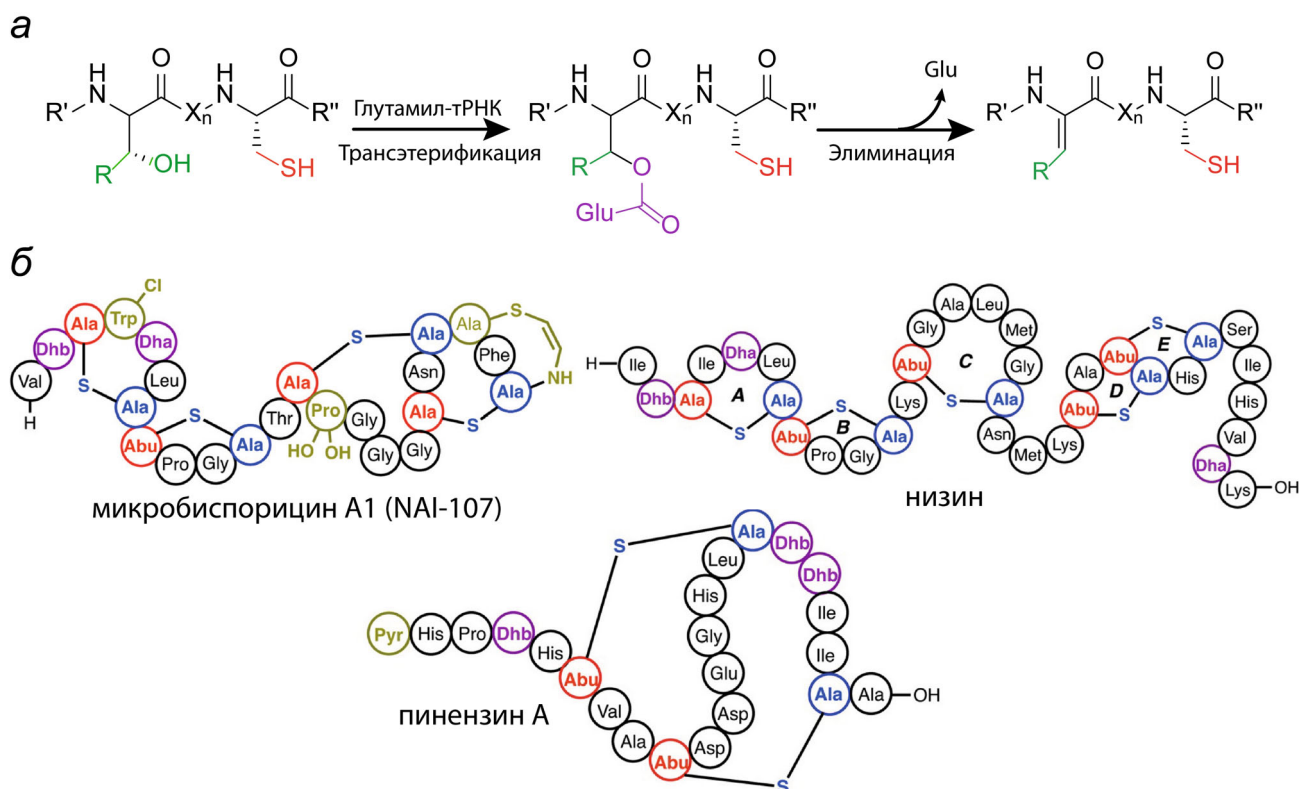


Рис. 3. *а* – Схема дегидратации лантибиотиков класса I ферментом LanB; *б* – структуры некоторых лантибиотиков класса I с различными посттрансляционными модификациями. Lac – лактат, Dha – дегидроаланин, Dhb – дегидробутирин, Pyr – 2-оксопропионил, Abu – альфа-аминомасляная кислота, R', R'' – участки полипептидной цепи лантипептида, X_n – участок полипептидной цепи, состоящий из n-кол-ва остатков аминокислот, где n – число от 1 до 20; адаптировано из [20]

Помимо основных модификаций, среди представителей данного класса лантипептидов распространено наличие лактата на N-конце полипептидной цепи [33] или ацетилирования [34], а также образования аминovinил цистеина (AviCys) на C-конце [35] (рис. 3, б). Самым известным представителем лантибиотиков класса I является нисин, который более 50 лет успешно используется в качестве консерванта в пищевой промышленности [36]. Лантибиотик микробиспорицин A1, также известный как NAI-107, обладает ярко выраженной активностью по отношению к клинически значимым патогенам, таким как *S. aureus* MRSA, *Clostridium difficile*. NAI-107 проходит стадии предклинических исследований для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными бактериями [37, 38]. Особенностью данного лантибиотика является наличие галогенированного остатка Trp и моно- или дигидроксилирование остатка Pro, которые необходимы для обеспечения антимикробной активности [39].

Класс II. В этот класс входят лантибиотики, дегидратацию и циклизацию которых выполняет мультифункциональный фермент LanM. На N-конце фермента расположен домен, ответ-

ственный за дегидратацию препептида. C-концевой домен гомологичен циклазе LanC лантибиотиков класса I и имеет цинк-связывающий домен. Исследования активности фермента *in vitro* показали, что для осуществления дегидратации необходимо присутствие АТФ и ионов Mg²⁺, а использование аналогов природного субстрата приводило к образованию промежуточного соединения, фосфорилированного по остаткам Ser/Thr [40]. Таким образом, у лантибиотиков класса II, а также III и IV, описанных далее, дегидратация остатков Ser и Thr происходит через стадию фосфорилирования, в то время как для лантибиотиков класса I процесс идет через глутаминированные производные (рис. 4). Для N-концевого домена LanM была обнаружена структурная гомология по отношению к эукариотическим липидкиназам, например фосфоинозитид-3-киназе (PI3K) [41], при этом последовательности этих ферментов имеют низкую идентичность.

Дегидратация и циклизация осуществляются ферментами LanM независимо, что подтверждается экспериментами с индивидуальной экспрессией каждого домена [42, 43]. Важным свойством лантипептидсинтетаз является стро-

гая стереоселективность в образовании тиоэфирных мостиков и региоселективность. Исключительным случаем является фермент CylM, модифицирующий двухкомпонентный лантибиотик класса II, цитолизин, из *Enterococcus faecalis*. Цитолизин состоит из двух пептидов: цитолизин L и цитолизин S, которые содержат два варианта метиллантионина – в классической конфигурации DL, характерной для большинства лантибиотиков, и более редкой – LL [44]. Таким образом, CylM способен формировать тиоэфирные мостики разной конфигурации внутри одного пептида. Лантипептидсинтетаза ProcM имеет широкий спектр субстратной специфичности. Анализ кластера биосинтеза прохлорозинов, к которому принадлежит ProcM, показал наличие 30 пептидов с разной аминокислотной последовательностью. Несмотря на большое количество вариантов субстратов, ProcM модифицирует каждый пре-пептид в лантипептид со строго определенной морфологией [45]. На сегодняшний день семей-

ство ProcM-подобных ферментов имеет самый широкий спектр субстратной специфичности [46].

В большинстве случаев транспорт осуществляется специфическим ABC-транспортером – LanT, который имеет также протеазный домен [47]. В процессе транспорта пре-пептида через мембрану лидерная последовательность удаляется, и во внеклеточную среду секретруется уже активный лантибиотик. Протеолиз происходит в области Gly-Gly мотива на С-конце лидера. Для осуществления транспорта LanT важна лидерная последовательность пептида, в то время как структурный пептид может отличаться от нативного [48]. Однако в случае с прохлорозинами и лихнецидином транспортер также толерантен и к лидерному пептиду, что подтверждают найденные отличия в лидерной последовательности среди лантибиотиков одного кластера. Для некоторых лантибиотиков класса II обнаруживают отдельные протеазы, которые осуществляют протеолиз нескольких аминокис-

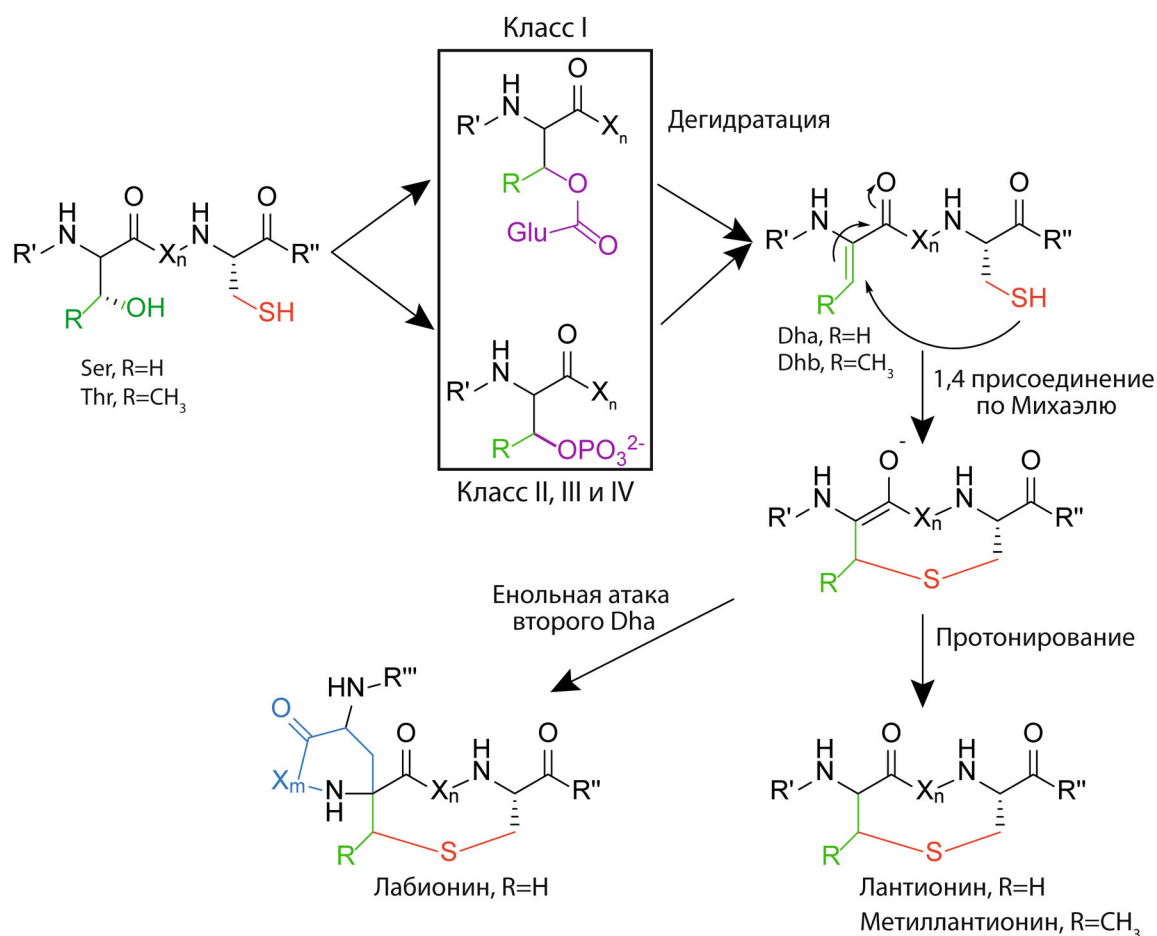


Рис. 4. Схема формирования тиоэфирных аминокислот при биосинтезе лантипептидов разных классов. Dha – дегидроаланин, Dhb – дегидробутирин, R', R'' – участки полипептидной цепи лантипептида, X_{n, m} – участок полипептидной цепи, состоящий из n- или m-кол-ва остатков аминокислот, где n и m – числа от 1 до 20

кислот с *N*-конца структурного пептида уже после процессинга лидерной последовательности [49].

Лантбиотики класса II отличаются более глобулярной структурой по сравнению с классом I, также среди них выделяют уникальную группу — двупептидные лантбиотики. Их антибиотическая активность обусловлена двойственным механизмом связывания с липидом II и формированием поры. Среди представителей этой группы можно выделить лактицин 3147, который активен против широкого спектра грамположительных бактерий, в том числе метицилин-резистентного *S. aureus*, ванкомицин-резистентного *E. faecalis*, *Propionibacterium acne* и *Streptococcus mutans* [50]. Другой двупептидный лантбиотик — галодурацин — проявляет большую активность по отношению к ванкомицин-резистентному *E. faecalis*, чем низин, и обладает большей стабильностью при физиологических условиях [51]. Традиционно в качестве источников новых лантбиотиков рассматривались молочнокислые бактерии, однако благодаря развитию в области полногеномного секвенирования и алгоритмов поиска новых кластеров все больше активных лантбиотиков находят и за пределами этой группы бактерий. Кластер биосинтеза тицина A4 был обнаружен в бактерии *Bacillus thuringiensis* BMB3201 [52]. Данный лантбиотик проявлял сходную с низином активность по отношению к широкому спектру грамположительных бактерий. Было установлено, что тицин A4 сохранял антибиотические свойства в диапазоне pH 2–9, а также обладал умеренной устойчивостью к обработке такими протеазами, как трипсин, папаин и α -амилаза.

Примером лантбиотика класса II, успешного с точки зрения медицинского применения, является NVB302. Это полусинтетическое производное дезоксиактагардина — лантбиотика из бактерии *Actinoplanes garbadinensis*. В 2012 г. компания Novacta сообщила об успешном прохождении первой стадии клинических исследований NVB302 по лечению инфекций, вызванных *C. difficile*. NVB302 имеет схожую с ванкомицином эффективность против *C. difficile*, его преимуществом является более быстрое восстановление популяции бактерий *Bacteroides fragilis* после окончания терапии [53]. *B. fragilis* являются частью нормальной микробиоты кишечника. Предполагается, что менее жёсткое влияние антибиотика на эту группу бактерий при клостридиальных инфекциях ведёт к меньшим флуктуациям в анаэробной кишечной микрофлоре и уменьшает риск возникновения рецидивов [54].

Класс III. Этот класс лантпептидов был выделен относительно недавно. Основные модификации выполняет мультифункциональный фермент LanKC [55]. В отличие от LanM, LanKC состоит из трех доменов: *N*-концевого лиазного, центрального киназного и *C*-концевого циклазного. Лиазный и киназный домены осуществляют дегидратацию, а циклазный домен формирует тиоэфирные кольца. LanKC не имеет цинк-связывающего мотива, однако проявляет гомологию с другими циклазными доменами [56]. Отличия наблюдаются и в структуре пептидов, поскольку среди некоторых представителей этого класса характерно формирование лабионина. Такие пептиды выделяют в группу лабиринтопептинов. Образование дополнительной связи углерод–углерод в лабионине происходит при атаке дегидроаланином енольного промежуточного соединения, которое в случае протонирования перешло бы в лантионин [57]. Реконструкция биосинтеза лабиринтопептинов *in vitro* показала, что процесс дегидратации происходит последовательно с *C*-конца пептида к *N*-концу, а лабионин формируется из мотива Ser(Xxx)2Ser(Xxx)3Cys. Дегидратация происходит через фосфорилированное производное, как в случае с лантбиотиками класса II. LanKC ферменты способны использовать в качестве субстрата разные нуклеозидтрифосфаты: LabKC при модификации лабиринтопептина использует только ГТФ [58], а AviKC, синтезирующий катенулипептин, способен использовать в качестве субстрата АТФ, ТТФ, ГТФ и ЦТФ [59].

Долгое время было неизвестно, как именно происходит процессинг лидерной последовательности, поскольку внутри кластера биосинтеза не было обнаружено специфической протеазы или транспортера с протеазным доменом. В процессе биосинтеза часто наблюдалось наличие нескольких остатков от лидерной последовательности на *N*-конце структурного пептида, поэтому основным предположением было наличие эндопептидазы, которая процессирует лидер, и аминопептидазы, удаляющей оставшиеся аминокислоты. Открытие лантпептида NAI-122 и изучение его биосинтетического кластера показало наличие специфической протеазы AplP с двойственной функцией [60]. Это цинк-зависимая бифункциональная протеаза с эндо- и аминопептидазной активностью. Вначале AplP, как эндопептидаза, отсекает лидерную последовательность по консервативному мотиву EL-Q, затем удаляет оставшиеся аминокислоты, как аминопептидаза [61]. Дальнейший анализ показал наличие AplP-подобных протеаз во всех геномах продуцентов лантпептидов

класса III, однако они находились за пределами их кластера биосинтеза. *In vitro* была подтверждена способность таких протеаз к формированию зрелых лантипептидов.

Известные на сегодняшний день лантипептиды класса III не проявляют явных антимикробных свойств, поэтому к ним не применяется термин лантибиотики. Считается, что они выполняют регуляторные функции в качестве сигнальных молекул. Для SapT показана способность стимулирования формирования воздушных гиф у стрептомицетов [62]. Потенциальное применение лантипептидов не ограничено наличием антибиотической активности. Исследования на мышинной модели боли показали антиноцицептивное действие лантипептида NAI-122 из *Actinoplanes* DSM 24059 [63]. Системное введение 1–10 мкг/кг NAI-122 приводило к дозозависимому снижению проявления болевого поведения, вызванного формалином у мышей. Также лантипептид проявлял активность в экспериментах по купированию хронической боли. Для некоторых лантипептидов было показано наличие противовирусных свойств. Лабиринтопептин A1 проявлял значительную активность против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса герпеса на клеточных моделях [64]. Синергическое действие с клинически одобренными антиретровирусными препаратами и низкая токсичность по отношению к вагинальным штаммам *Lactobacillus* показывают его потенциал в области лечения заболеваний, передающихся половым путем.

Класс IV. Это одна из наименее изученных групп лантипептидов, известных на сегодняшний день. Первая охарактеризованная система биосинтеза лантипептида класса IV была обнаружена в *Streptomyces venezuelae* после геномного скрининга на поиск белков гомологичных LanC. Пептид получил название венецуелин, а его синтетаза – VenL [65]. Лантипептидсинтазы класса IV LanL – это мультифункциональные ферменты, состоящие из трех доменов: лиазный и киназный домены гомологичны таковым у LanKC, а циклазный – LanM, поскольку имеет характерный цинк-связывающий мотив. Несмотря на наличие всех компонентов кластера биосинтеза венецуелина, его продукция не была детектирована у штамма дикого типа. Определение структуры и свойств пептида и фермента LanL проводилось *in vitro*. В ходе филогенетического анализа актинобактерий на наличие LanC-подобных белков были выделены семейства лантипептид-подобных генетических кластеров [66]. В частности, это позволило обнаружить несколько венецуелин-подобных пептидов, распространенных среди бактерий рода

Streptomyces. Подобным образом был обнаружен другой лантипептид из этого семейства, продуцируемый *Streptomyces collinus* Tu 365, – стрептоколлин [67]. На примере системы биосинтеза глобиспорицина было проведено исследование процессов дегидратации и циклизации ферментом LanL [68]. Было установлено, что фермент SgbL узнает α -спиральный участок лидерного пептида, расположенный в его N-концевой части, при этом распознавание происходит в киназной части SgbL, но не в лиазной. Процесс дегидратации происходит последовательно с N-конца к C-концу структурного пептида через фосфорилированное производное.

Специфической протеазы для процессинга лидерной последовательности лантипептидов класса IV на настоящий момент не обнаружено. Предполагается, что созревание лантипептида происходит при участии собственных эндопептидаз и аминокептидаз продуцента.

В настоящее время биологическая функция лантипептидов класса IV остаётся неизвестной. Для стрептоколлина была обнаружена умеренная ингибирующая активность по отношению к протеинтирозинфосфатазе 1B (PTP1B) – 33% ингибирования при концентрации стрептоколлина 50 мкМ [67].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАНТИБИОТИКОВ

Впервые антимикробный эффект лантибиотиков был обнаружен в 1927 г. при изучении ингибирующего влияния *Lactococcus lactis* на рост *Lactobacillus bulgaricus* [69], и в 1947 г. Mattick et al. [70] выделили из культивационной среды *L. lactis* лантибиотик низин. Сейчас он широко используется в пищевой промышленности многих стран в качестве консерванта (пищевая добавка E243). Низин является наиболее исследованным представителем лантибиотиков с широко изученным спектром антимикробной активности, механизмом действия и биосинтеза.

Липид II является основной мишенью для многих лантибиотиков на поверхности грамположительных бактерий. Эта молекула играет важнейшую роль в формировании клеточной стенки бактерий. Она играет роль переносчика пептидогликанов клеточной стенки бактерий с внутренней стороны мембраны, где они образуются, на наружную, где созревает клеточная стенка. Поскольку количество молекул липида II в мембране бактерий ограничено [71], его связывание с молекулами лантибиотика блокирует синтез клеточной стенки, что в дальнейшем приводит к гибели клетки. Важной особенностью

липид II является его консервативность среди прокариот, поэтому антибиотики, связывающие липид II, обладают широким спектром активности и оставляют перспективную область исследований для поиска новых антибиотиков [72]. Эта молекула является уникальной для прокариот, что делает подобные антимикробные агенты потенциально безопасными для эукариотических клеток. В группу антибиотиков, связывающих липид II, входит ванкомицин — трициклический гликопептид, использующийся в медицине при лечении серьёзных инфекционных заболеваний, в том числе вызванных мультирезистентными бактериями, и является одним из «антибиотиков последнего резерва». Однако в последнее время растёт количество штаммов патогенных бактерий резистентных к ванкомицину. В этой связи лантибиотики могут перенять эстафету, поскольку связываются с другим участком на молекуле липида II (рис. 5) и могут ингибировать рост бактерий, резистентных к известным антибиотикам. В экспериментах *in vitro* было показано, что лантибиотик микробиспорин способен останавливать рост штамма *E. faecalis*, резистентного к ванкомицину с минимальной ингибирующей концентрацией 0,5 мкг/мл [39], низин — 4 мкг/мл [39], дипептидный лантибиотик лактицин 3147 — 1,9 мкг/мл [73].

Помимо ингибирования биосинтеза клеточной стенки, некоторые лантибиотики способны

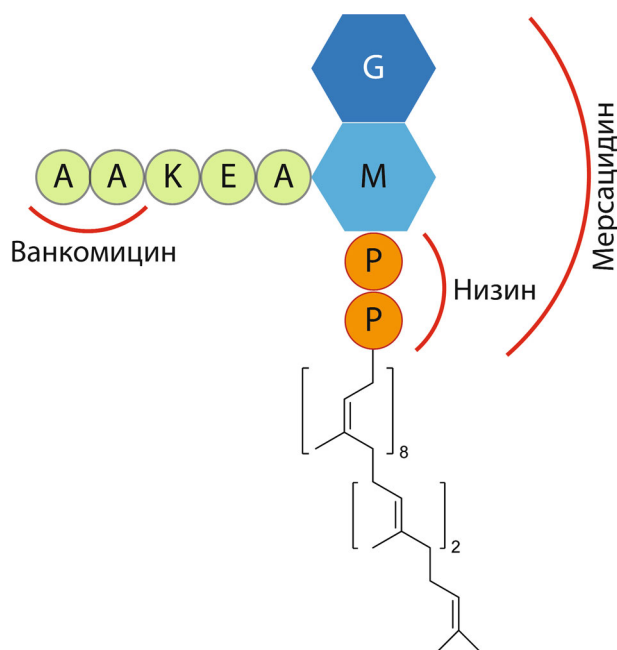


Рис. 5. Схема строения липида II; G — N-ацетилглюкозамин, M — N-ацетилмуравьиная кислота, P — фосфатная группа; красными линиями отмечены области связывания ванкомицина, низина и мерсацидина

формировать поры в плазматической мембране (рис. 6), что также приводит к гибели бактериальной клетки [74]. Образование поры в большинстве случаев является липид II-зависимым, поскольку именно так лантибиотик связывается с мембраной бактерии. В случае низина два кольца в N-концевой части формируют пиррофосфат-связывающий карман, который связывает ундекапренилпиррофосфатную часть липида II, а C-конец принимает участие в образовании поры [75]. В исследовании Hasper et al. [76] было показано, что в образовании поры участвуют 8 молекул низина и 4 молекулы липида II, которые обеспечивают связывание лантибиотика с мембраной.

Обособленно находится группа циннамицин-подобных лантибиотиков, в которую также входит дурамицин и анковерин. Помимо глобулярной структуры и наличия остатка неканонической аминокислоты — лизиноаланина, они отличаются мишенью, с которой связываются на клеточной мембране, а именно — фосфатидилэтаноламином [77]. Фосфатидилэтаноламин (PE) — важный представитель фосфолипидов, одной из функций которого является распределение отрицательного заряда на мембране, он также играет роль предшественника для синтеза других фосфолипидов, принимает участие в сигнальных каскадах [78] и придаёт особые физико-химические свойства плазматической мембране, необходимые для функционирования мембранных белков [79]. В эукариотических клетках PE в основном представлен на внутренней поверхности плазматической мембраны. Для большинства бактерий PE является главным цвиттерийным фосфолипидом. При этом у грамотрицательных бактерий содержание PE в мембране выше, чем у грамположительных бактерий [80]. Высокая селективность циннамицин-подобных лантибиотиков по отношению к PE обеспечивается за счёт формирования сети водородных связей с фосфатами липидов. В отличие от более объёмной холиновой группы фосфатидилхолина, компактная структура аммоний-связывающего домена циннамицин-подобных лантибиотиков комплементарна небольшой группе PE [81]. Точный механизм антимикробного действия этой группы лантибиотиков до сих пор неизвестен, однако предполагается, что связывание циннамицина с фосфатидилэтаноламином приводит к увеличению проницаемости клеточной мембраны, что и приводит к гибели клетки [82]. Для дурамицина было показано изменение морфологии и нарушение целостности клеток у чувствительных штаммов *Bacillus* BC15 и *Bacillus subtilis* 168 [83]. Было установлено, что

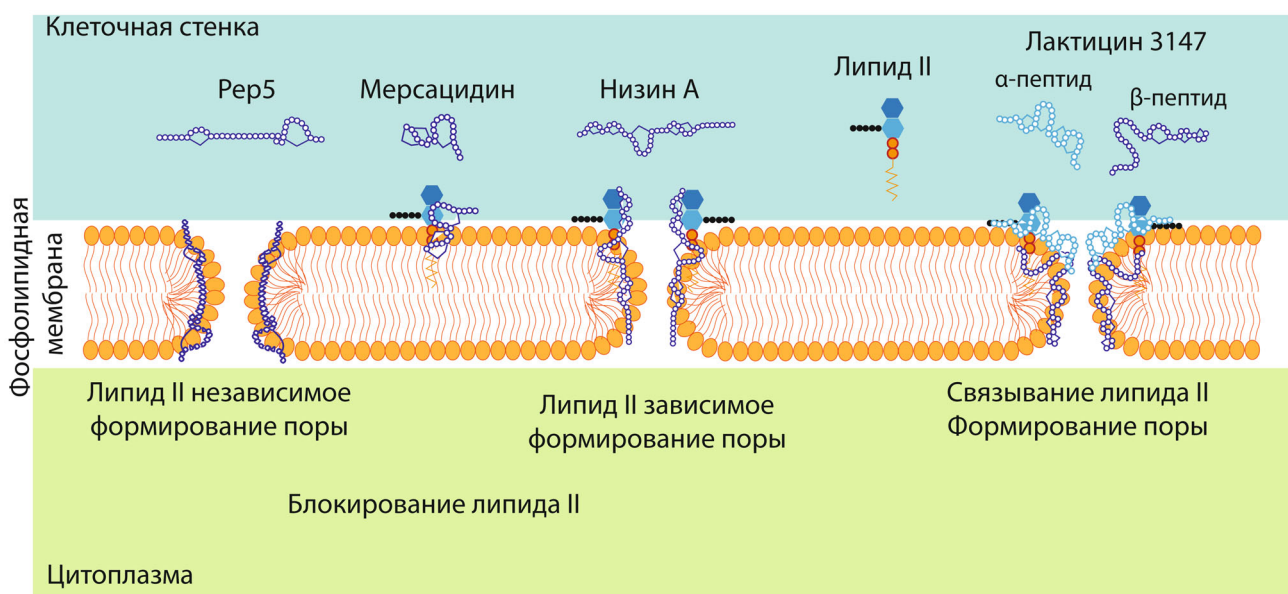


Рис. 6. Схематическое представление разных механизмов антимикробного действия лантибиотиков на грамположительные бактерии

чувствительные штаммы бактерий развивали резистентность и к более высоким его концентрациям после инкубации с низкой концентрацией лантибиотика. Анализ состава бактериальных мембран до и после появления резистентности показал, что бактерии с приобретённой устойчивостью имели пониженное содержание фосфатидилэтаноламина. Таким образом, чувствительность микроорганизмов к лантибиотикам из семейства циннамицинов явно коррелирует с фосфолипидным составом бактериальных мембран, что ограничивает их применение в качестве антибиотиков широкого спектра. Тем не менее селективность по отношению к PE находит потенциальное применение в медицине. Дурамицин проходит вторую фазу клинических испытаний в качестве лекарства для лечения муковисцидоза [84]. Связывание дурамицина с PE на поверхности эпителиальных клеток лёгких стимулирует секрецию хлорид-ионов, что, в свою очередь, влечёт секрецию воды и стимулирует очищение лёгких от слизи. Циннамицин-подобные лантибиотики также находят применение в биоимиджинге. Фосфатидилэтаноламин становится широко представленным на поверхности клетки при апоптозе [85], а также при делении эукариотической клетки [86], что позволяет использовать его в качестве молекулярного маркера при изучении клеточных процессов. Для детекции PE на поверхности клеток используют биотинилированные или радиоактивно-меченные дурамицин и циннамицин [87].

БИОИНЖЕНЕРИЯ ЛАНТИБИОТИКОВ И НАПРАВЛЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Лантибиотики обладают высоким потенциалом в области создания новых противомикробных препаратов. Традиционная стратегия в поиске антибиотиков заключается в выделении природного штамма-продуцента из разных источников и анализе антимикробных свойств его метаболитов. Такой подход имеет ограничения, поскольку подходит только для культивируемых бактерий. Благодаря развитию технологий полногеномного секвенирования и геномного майнинга появляется возможность открывать новые ранее не выделенные из природных источников лантибиотики, в том числе и среди представителей некультивируемых микроорганизмов. Для изучения обнаруживаемых биосинтетических кластеров лантибиотиков используют различные подходы синтетической биологии от бесклеточных систем до гетерологической продукции.

Бесклеточные системы практически не ограничены в размерах комбинаторной библиотеки, поскольку нет необходимости в трансформации клеток продуцента — стадии, лимитирующей данный параметр в клеточных системах биосинтеза. *In vitro* система синтеза библиотеки лантипептидов была разработана на основе мРНК дисплея [88]. Основой для пептидного синтеза являлась *in vitro* транскрибированная мРНК. Для соединения мРНК с транслируемым пепти-

дом использовался олигонуклеотид, несущий пуромидин на 3'-конце открытой рамки считывания. Данный олигонуклеотид присоединялся к 3'-концу мРНК посредством фотоиндуцируемой кросс-сшивки за счёт наличия на его 5'-конце псоралена. Аминокислота лизин была заменена на 4-селенолизин, который при обработке перекисью водорода трансформировался в дегидроаланин. После иммобилизации пре-пептида на колонке и соответствующей смены буферов происходило формирование лантионинов. Таким образом, была получена полностью искусственная бесферментативная система для создания более чем 10^{11} вариантов лантипептидов. С её помощью были выделены молекулы с высокой специфичностью к сортазе А — ферменту, ответственному за вирулентность *S. aureus*.

Использование гетерологических систем экспрессии позволяет набирать их в количествах, достаточных для проведения полноценных исследований их структуры и функций. Гетерологические системы экспрессии кластеров лантибиотиков находят применение в широко-масштабном скрининге библиотек мутантных вариантов лантибиотиков и поиске более активных и стабильных соединений.

L. lactis — представитель молочнокислых бактерий, который часто используется для гетерологической экспрессии белков. На основе его кластера биосинтеза низина была создана система экспрессии NICE (NIsin-Controlled Expression system) [89]. Продукция низина в *L. lactis* и других низин-продуцирующих бактериях является аутоиндуцируемой. При появлении в среде низина мембранно-ассоциированная киназа NisK автофосфорилируется, затем фосфорилирует внутриклеточный регуляторный белок NisR, который связывается с промотором *nisA* и запускает экспрессию генов, стоящих за ним. Таким образом, обеспечивается регулируемая гиперэкспрессия необходимого рекомбинантного лантибиотика. Кластер биосинтеза лантибиотика класса II нукацина ISK-1 был исследован с помощью NICE системы [90]. Данный подход позволил снизить уровень протеолитической деградации лантибиотика, которая наблюдалась у природного продуцента, а также определить минимальный набор генов, необходимых для продукции активного лантибиотика.

Многочисленные структурно-функциональные исследования лантибиотиков показали наличие характерных мотивов и определенной топологии колец, обеспечивающих присущий им механизм действия, например пирофосфат-связывающая полость у низин-подобных лантибиотиков [75] или мотив, связывающий липид II

[91]. Основываясь на подобной модульной системе, была создана библиотека искусственных лантипептидов, которые состояли из комбинации модулей 12 известных лантибиотиков. Соответствующие генетические конструкции были использованы для трансформации бактерии-продуцента *L. lactis*, имеющей в своём геноме кластер биосинтеза низина, осуществляющего посттрансляционные модификации и транспорт зрелого лантипептида во внеклеточную среду. Для быстрого тестирования биологической активности бактерии продуценты помещались в альгинатные шарики вместе с индикаторным штаммом бактерии и специфической протеазой, процессирующей лидерный пептид для высвобождения активного лантибиотика. После инкубации и окрашивания флуоресцентным красителем шарики сортировались с помощью проточной цитофлуориметрии. Химерные молекулы, состоящие из модулей галлидермина и низина, показали улучшенную активность по отношению к *Streptococcus pneumoniae* в сравнении с природными лантибиотиками. Подобная технология имеет перспективы для тестирования активности потенциальных пептидных препаратов *in vivo*, поиска соединений с новыми спектрами биологической активности.

E. coli является самым распространенным микроорганизмом для гетерологической экспрессии белков и пептидов, в том числе и антимикробной природы [92]. Преимуществами её использования в работе являются простота, лёгкость проведения генетических манипуляций, доступность различных вариантов экспрессии: от добавления меток для увеличения растворимости и упрощения очистки рекомбинантного белка до направления продукции в периплазматическое пространство [93]. Несколько систем биосинтеза лантибиотиков были успешно реконструированы с использованием *E. coli* в качестве продуцента [25]. Прохлорозины, синтезированные в *E. coli*, имели значительно больший выход по сравнению с природным продуцентом *Prochlorococcus* MIT 9313, при этом являлись полностью модифицированными.

После разработки гетерологических систем экспрессии следует этап их применения для поиска новых улучшенных вариантов лантибиотиков. Лидерная последовательность ингибирует антимикробные свойства полностью модифицированного лантибиотика. Поэтому после работы и очистки пре-пептида используют коммерчески доступные протеазы, процессирующие полипептид. Необходимость очистки, а также последующей обработки протеазами усложняет процесс анализа активности лантибиотиков, особенно при скрининге большого коли-

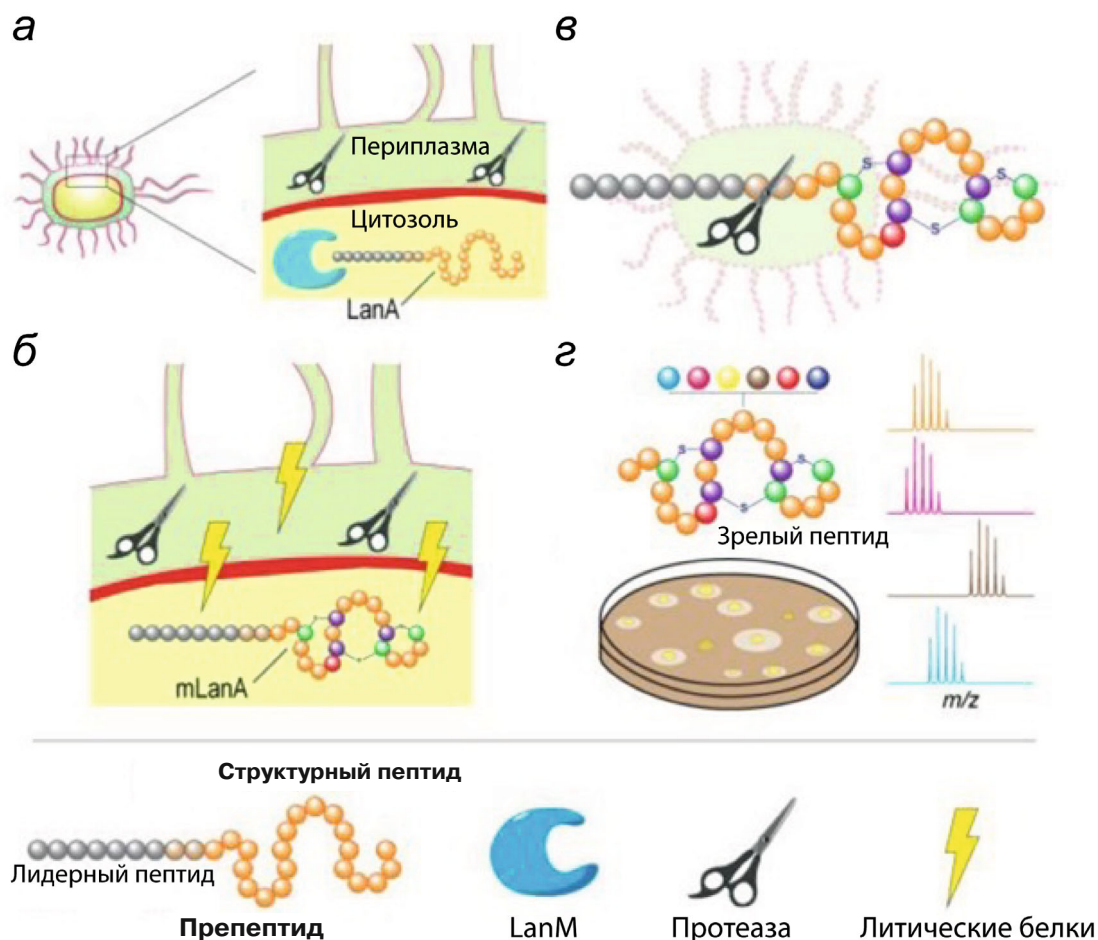


Рис. 7. Схематическое изображение системы для производства зрелых лантибиотиков класса II в *E. coli*; а – периплазматическая компартментализация протеазы; б – температурная индукция экспрессии автолитических белков; в – процессинг лидерного пептида после автолиза; г – структурно-функциональный скрининг вариантов лантипептидов на колониях с помощью метода диффузии в агаре и matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) анализа; адаптировано из [94]

чества вариантов. Для решения данной проблемы была предложена система, позволяющая процессировать лидерный пептид внутри колоний *E. coli* для быстрого скрининга лантибиотической активности [94]. Лантипептид синтезировался внутриклеточно, в то время как продукция специфической лантипептидпротеазы LicP была направлена в периплазматическое пространство (рис. 7). После индуцированного температурой автолиза клеток протеаза и препептид высвобождались из клеток, затем происходил процессинг активного лантибиотика, который детектировали по образованию зон ингибирования роста. Успешное применение такой системы было продемонстрировано на примерах дипептидного лантибиотика галодурацина и лантибиотика лактицина 481.

Благодаря генетически кодируемой природе лантибиотиков возможно легко вносить изменения в их структуру. Это позволяет использо-

вать методы направленного или случайного мутагенеза для создания лантибиотиков с улучшенными свойствами, а также для понимания их структурно-функциональных особенностей. Мутации R13A и K2A/R13A лантибиотика мутаций 1140 приводили к увеличению устойчивости к протеолизу трипсином [95]. Замена остатка Met21 на Val в молекуле низина приводила к увеличению активности по отношению к *Listeria monocytogenes*, а мутант N20P был более активен против *S. aureus* [96].

Лантибиотики в основном действуют на грамположительные бактерии, поскольку грамотрицательные бактерии защищены от их действия внешней оболочкой. Для расширения спектра действия лантибиотиков принимаются различные попытки по созданию химерных молекул, способных преодолевать внешнюю мембрану и атаковать грамотрицательные бактерии. Было предложено использовать конъюгаты

лантибиотика галлидермина с молекулами сидерофоров [97]. Предполагалось, что наличие специфических рецепторов к сидерофорам на внешней мембране помогут конъюгату преодолеть внешний барьер и сделать внутреннюю мембрану доступной для лантибиотика. Однако, несмотря на сохранившуюся активность по отношению к индикаторной грамположительной бактерии *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NR, грамотрицательные бактерии оказались невосприимчивы к антимикробному действию конъюгата. Альтернативно, короткие пептиды с известной активностью против грамотрицательных бактерий были соединены с C-концом полноразмерного или укороченного низина [98]. Несколько вариантов таких химерных молекул ингибировали рост индикаторных штаммов. Для наиболее перспективных вариантов был проведен рациональный дизайн. В результате было получено соединение в 4–12 раз более активное по отношению к ряду важных грамотрицательных патогенов в сравнении с низином.

Наличие макроциклов в структуре лантибиотиков делают их удобными мишенями для разработки ингибиторов белок-белковых взаимодействий, поскольку они могут выступать в роли структурных аналогов природным лигандам. В сравнении с синтетическими методами синтеза генетически кодируемая природа лантибиотиков позволяет создавать огромные библиотеки вариантов и совмещать пептидный синтез со скринингом внутри клетки. Существует множество подходов к отбору соединений из библиотек с необходимыми свойствами, одним из них является обратный двугибридный анализ (reverse two-hybrid system (RTHS)). Данный метод был использован для получения ингибитора взаимодействия между белком рВ вируса иммунодефицита человека с убиквитин-связывающим доменом UEV (ubiquitin E2 variant) белка человека TSG101 [99]. Такие ингибиторы имеют высокий терапевтический потенциал в противовирусной терапии, поскольку нарушают процесс отпочковывания ВИЧ от заражённой клетки. В качестве основы для создания библиотеки

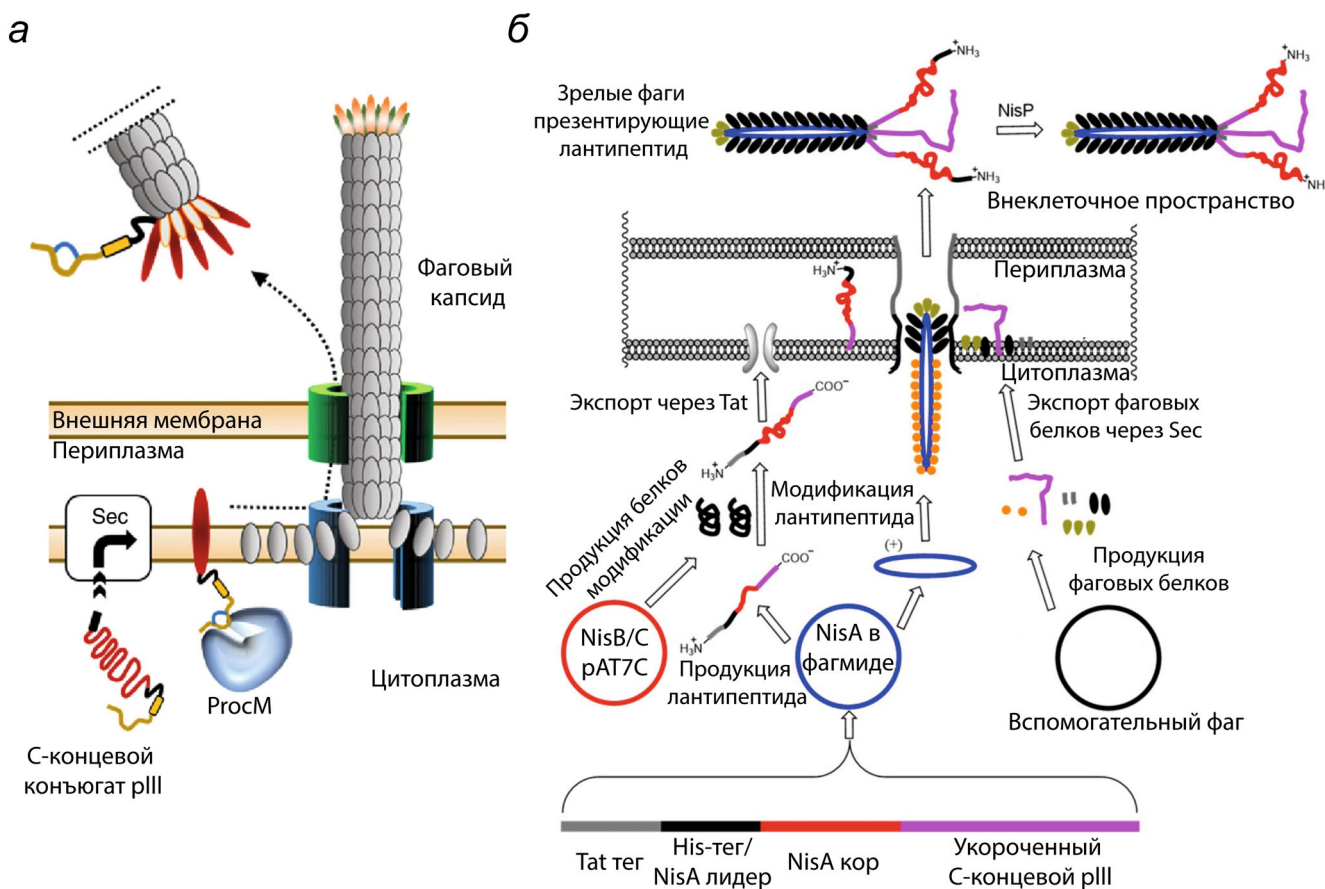


Рис. 8. Схема созреваия фаговых частиц. *а* – С-концевой дисплей лантипептидов, модифицированных ProcM; адаптировано из [101]; *б* – N-концевой дисплей библиотеки лантипептидов на основе системы биосинтеза низина; адаптировано из [102]

макроциклов была использована последовательность лантипептида ProсA2.8, а формирование тиоэфирных связей осуществляла лантипептидсинтетаза ProсM, известная высокой толерантностью к субстрату. Белки р6 и домен UEV продуцируются внутриклеточно в виде химерных молекул с функциональными репрессорами. Их физическое взаимодействие приводит к ингибированию экспрессии репортерных генов, обеспечивающих рост бактерии на селективной среде. Таким образом, среди бактерий, трансформированных библиотекой лантипептидов, на селективной среде вырастут только те, чей вариант пептида ингибирует взаимодействие между р6 и доменом UEV. Результатом отбора стал ингибитор ХУ3-3, который проявлял потенциальную противовирусную активность, детектированную с использованием клеточной модели созревания вирусных частиц *in vitro*.

Фаговый дисплей является мощным инструментом в *in vitro* селекции, широко используемый для скрининга пептидных лигандов к выбранной мишени [100]. Эту технологию также применяют для скрининга лантипептидных библиотек. Кластер биосинтеза прохлорозинов с ProсM синтетазой был взят за основу для создания C-концевой библиотеки пептидов [101]. Препептид соединяли с C-концом рIII белка капсида бактериофага M13. Все модификации проходили в цитоплазме. Фаговый дисплей модифицированных пептидов осуществлялся в результате включения конъюгата рIII в фаговую оболочку с последующей экструзией частицы фага в среду (рис. 8, а).

По результатам отбора были получены лиганды к стрептавидину и урокиназному активатору плазминогена, что показывает потенциал использования системы биосинтеза лантипептидов совместно с технологией фагового дисплея.

Для дисплея библиотеки вариантов лантибиотика низина была разработана технология N-концевого фагового дисплея [102]. В отличие от предыдущей работы, секреция конъюгата в периплазму осуществлялась по Tat-пути, который позволяет транслоцировать свернутые белки (рис. 8, б). Вектором отбора служила улучшенная стабильность производных низина при более высоких значениях рН. Однако, несмотря на успешную селекцию нескольких вариантов и сохранение способности связывать липид II, антимикробная активность была утрачена. Также был представлен вариант дрожжевого дисплея, в котором лантибиотик лактицин 481 был соединён с белком клеточной стенки дрожжей. Модификации происходили в эндоплазматическом ретикулуме. После подтверждения наличия всех

необходимых модификаций с помощью анализа биологической активности и масс-спектрометрии очищенного лантибиотика была создана библиотека аналогов лактицина 481. В ходе селекции были получены пептиды, способные к связыванию с $\alpha\nu\beta 3$ интегрином. Результаты исследования показывают универсальность применения лантипептидных кластеров биосинтеза для поиска соединений с новыми биологическими свойствами.

ВЫВОДЫ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

В эпоху быстро распространяющейся резистентности к антибиотикам необходимо разрабатывать системы, позволяющие ускорить процесс идентификации новых антимикробных агентов. Для этого крайне важно находить новые источники биологического разнообразия и создавать подходы для эффективного анализа большого количества данных. Технологии направленной эволюции антибиотической активности позволяют создавать искусственное разнообразие антимикробных агентов и отбирать из этого разнообразия наиболее эффективные варианты с точки зрения их практического применения. Высокопроизводительный скрининг соединений, генерируемых биохимическими машинериями, представляет при этом особый интерес. Объединение этапов синтеза и проверки биологической активности в единой системе в перспективе позволят сократить количество стадий анализа молекул-кандидатов, времени, а также экономических затрат.

В настоящее время большое развитие получили микрофлюидные технологии. В частности, капельная микрофлюидика успешно применяется в различных биологических исследованиях. Основным преимуществом является возможность локализации реакций в индивидуальных каплях, что позволяет проводить сотни миллионов реакций параллельно [103]. Это свойство успешно применяется при разработке платформ полного цикла для ультра-высокопроизводительного скрининга и направленной эволюции полипептидов [104]. Инкапсуляция на уровне единичных клеток даёт возможность детально изучать влияние множества факторов на физиологическое состояние микроорганизмов [105], проводить широкомасштабный скрининг антибиотической активности среди представителей разных микробиологических сообществ [106].

Лантибиотики, в свою очередь, имеют большой потенциал в качестве универсальной матрицы для создания молекул с заданными биологи-

ческими функциями: от ингибиторов белок-белковых взаимодействий до терапевтических препаратов и антибиотиков нового поколения. Объединение биосинтетических машинерий, генерирующих множество вариантов лантибиотиков, с технологиями микрофлюидики позволит проводить ширококомасштабный поиск соединений, активных по отношению к заданной мишени. Использование гетерологических систем продукции лантибиотиков, а также адаптация бесклеточных систем для генерации биологически активных лантибиотиков *in vitro* являются одними из ключевых этапов дальнейшего развития данной технологии. Объединение этапов биосинтеза и тестирования биологической активности синтетического разнообразия рекомбинантных лантибиотиков в индивидуальных микрокомпартаментах позволит добиться непревзой-

дённой производительности скрининга, открывая уникальные возможности для анализа ландшафтов антимикробной активности генетически кодируемых антибиотиков и создания высокоэффективных терапевтических агентов.

Финансирование. Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08054) и Российского научного фонда (грант № 17-74-30019).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Davies, J., and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74**, 417-433, doi: 10.1128/mmbr.00016-10.
- O'Neill, J. (2014) *Antimicrobial Resistance: Tackling A Crisis For The Health And Wealth Of Nations*, Review on Antimicrobial Resistance, London.
- Czepiel, J., Drozd, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultanska, D., Garlicki, A., and Biesiada, G. (2019) *Clostridium difficile* infection: review, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **38**, 1211-1221, doi: 10.1007/s10096-019-03539-6.
- Wang, J., Xiong, Z., Meng, H., Wang, Y., and Wang, Y. (2012) Synthetic biology triggers new era of antibiotics development, *Subcell Biochem.*, **64**, 95-114, doi: 10.1007/978-94-007-5055-5_5.
- Foulston, L. (2019) Genome mining and prospects for antibiotic discovery, *Curr. Opin. Microbiol.*, **51**, 1-8, doi: 10.1016/j.mib.2019.01.001.
- Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Malakhova, M. V., Samoilov, A. E., Manolov, A. I., et al. (2018) Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9551-9556, doi: 10.1073/pnas.1811250115.
- Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., et al. (2020) A deep learning approach to antibiotic discovery, *Cell*, **180**, 688-702, doi: 10.1016/j.cell.2020.01.021.
- Lau, J. L., and Dunn, M. K. (2018) Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 2700-2707, doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
- Fosgerau, K., and Hoffmann, T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug Discov. Today*, **20**, 122-128, doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003.
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., and He, Q. (2019) The antimicrobial peptides and their potential clinical applications, *Am. J. Transl. Res.*, **11**, 3919-3931.
- Kang, S. J., Park, S. J., Mishig-Ochir, T., and Lee, B. J. (2014) Antimicrobial peptides: therapeutic potentials, *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, **12**, 1477-1486, doi: 10.1586/14787210.2014.976613.
- Ortega, M. A., and van der Donk, W. A. (2016) New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products, *Cell Chem. Biol.*, **23**, 31-44, doi: 10.1016/j.chembiol.2015.11.012.
- McIntosh, J. A., Donia, M. S., and Schmidt, E. W. (2009) Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds, *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 537-559, doi: 10.1039/b714132g.
- Muller, M. M. (2018) Post-translational modifications of protein backbones: unique functions, mechanisms, and challenges, *Biochemistry*, **57**, 177-185, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00861.
- Hudson, G. A., and Mitchell, D. A. (2018) RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential, *Curr. Opin. Microbiol.*, **45**, 61-69, doi: 10.1016/j.mib.2018.02.010.
- Mullane, K., Lee, C., Bressler, A., Buitrago, M., Weiss, K., et al. (2015) Multicenter, randomized clinical trial to compare the safety and efficacy of LFF571 and vancomycin for *Clostridium difficile* infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 1435-1440, doi: 10.1128/aac.04251-14.
- Poorinmohammad, N., Bagheban-Shemirani, R., and Hamed, J. (2019) Genome mining for ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) reveals undiscovered bioactive potentials of actinobacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **112**, 1477-1499, doi: 10.1007/s10482-019-01276-6.
- Velasquez, J. E., and van der Donk, W. A. (2011) Genome mining for ribosomally synthesized natural products, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 11-21, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.027.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., et al. (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, *Nat. Prod. Rep.*, **30**, 108-160, doi: 10.1039/C2NP20085F.
- Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., and van der Donk, W. A. (2017) Mechanistic understanding of lan-

- thipeptide biosynthetic enzymes, *Chem. Rev.*, **117**, 5457–5520, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00591.
21. Kleerebezem, M. (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis, *Peptides*, **25**, 1405–1414, doi: 10.1016/j.peptides.2003.10.021.
 22. Willey, J. M., Willems, A., Kodani, S., and Nodwell, J. R. (2006) Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*, *Mol. Microbiol.*, **59**, 731–742, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05018.x.
 23. Bierbaum, G., Gotz, F., Peschel, A., Kupke, T., van de Kamp, M., and Sahl, H. G. (1996) The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**, 119–127, doi: 10.1007/BF00399417.
 24. Zhang, Q., Yu, Y., Velasquez, J. E., and van der Donk, W. A. (2012) Evolution of lanthipeptide synthetases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18361–18366, doi: 10.1073/pnas.1210393109.
 25. Shi, Y., Yang, X., Garg, N., and van der Donk, W. A. (2011) Production of lanthipeptides in *Escherichia coli*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2338–2341, doi: 10.1021/ja109044r.
 26. Garg, N., Salazar-Ocampo, L. M., and van der Donk, W. A. (2013) *In vitro* activity of the nisin dehydratase NisB, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7258–7263, doi: 10.1073/pnas.1222488110.
 27. Ortega, M. A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M. C., van der Donk, W. A., and Nair, S. K. (2015) Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB, *Nature*, **517**, 509–512, doi: 10.1038/nature13888.
 28. Siezen, R. J., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (1996) Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**, 171–184, doi: 10.1007/BF00399422.
 29. Goto, Y., Okesli, A., and van der Donk, W. A. (2011) Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family, *Biochemistry*, **50**, 891–898, doi: 10.1021/bi101750r.
 30. Hollenstein, K., Dawson, R. J., and Locher, K. P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 412–418, doi: 10.1016/j.sbi.2007.07.003.
 31. Kuipers, A., de Boef, E., Rink, R., Fekken, S., Kluskens, L. D., Driessen, A. J., Leenhouts, K., Kuipers, O. P., and Moll, G. N. (2004) NisT, the transporter of the lantibiotic nisin, can transport fully modified, dehydrated, and unmodified prenisin and fusions of the leader peptide with non-lantibiotic peptides, *J. Biol. Chem.*, **279**, 22176–22182, doi: 10.1074/jbc.M312789200.
 32. Lagedroste, M., Smits, S. H. J., and Schmitt, L. (2017) Substrate specificity of the secreted nisin leader peptidase NisP, *Biochemistry*, **56**, 4005–4014, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00524.
 33. Velasquez, J. E., Zhang, X., and van der Donk, W. A. (2011) Biosynthesis of the antimicrobial peptide epilancin 15X and its N-terminal lactate, *Chem. Biol.*, **18**, 857–867, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.05.007.
 34. Huang, E., and Yousef, A. E. (2015) Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*, *Microbiol. Res.*, **181**, 15–21, doi: 10.1016/j.micres.2015.08.001.
 35. Allgaier, H., Jung, G., Werner, R. G., Schneider, U., and Zähner, H. (1985) Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized, tetracyclic heterodetic polypeptide antibiotic, *Angew. Chem. Internat. Ed. Engl.*, **24**, 1051–1053, doi: 10.1002/anie.198510511.
 36. de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., and Vessoni Penna, T. C. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review, *Trends Food Sci. Technol.*, **20**, 146–154, doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.056.
 37. Lepak, A. J., Marchillo, K., Craig, W. A., and Andes, D. R. (2015) *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of the lantibiotic NAI-107 in a neutropenic murine thigh infection model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 1258–1264, doi: 10.1128/AAC.04444-14.
 38. Thomsen, T. T., Mojsoska, B., Cruz, J. C., Donadio, S., Jenssen, H., Lobner-Olesen, A., and Rewitz, K. (2016) The Lantibiotic NAI-107 efficiently rescues *Drosophila melanogaster* from infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 5427–5436, doi: 10.1128/AAC.02965-15.
 39. Castiglione, F., Lazzarini, A., Carrano, L., Corti, E., Ciciliato, I., et al. (2008) Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens, *Chem. Biol.*, **15**, 22–31, doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.009.
 40. Chatterjee, C., Miller, L. M., Leung, Y. L., Xie, L., Yi, M., Kelleher, N. L., and van der Donk, W. A. (2005) Lactacin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15332–15333, doi: 10.1021/ja0543043.
 41. Dong, S. H., Tang, W., Lukk, T., Yu, Y., Nair, S. K., and van der Donk, W. A. (2015) The enterococcal cytolysin synthetase has an unanticipated lipid kinase fold, *eLife*, **4**, e07607, doi: 10.7554/eLife.07607.
 42. Ma, H., Gao, Y., Zhao, F., and Zhong, J. (2015) [Individual catalytic activity of two functional domains of bovicin HJ50 synthase BovM], *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **55**, 50–58.
 43. Shimafuji, C., Noguchi, M., Nishie, M., Nagao, J., Shioya, K., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2015) *In vitro* catalytic activity of N-terminal and C-terminal domains in NukM, the post-translational modification enzyme of nukacin ISK-1, *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 624–629, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.020.
 44. Tang, W., Jimenez-Oses, G., Houk, K. N., and van der Donk, W. A. (2015) Substrate control in stereoselective lanthionine biosynthesis, *Nat. Chem.*, **7**, 57–64, doi: 10.1038/nchem.2113.
 45. Thibodeaux, C. J., Ha, T., and van der Donk, W. A. (2014) A price to pay for relaxed substrate specificity: a comparative kinetic analysis of the class II lanthipeptide synthetases ProcM and HalM2, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 17513–17529, doi: 10.1021/ja5089452.
 46. Cubillos-Ruiz, A., Berta-Thompson, J. W., Becker, J. W., van der Donk, W. A., and Chisholm, S. W. (2017) Evolutionary radiation of lanthipeptides in marine cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E5424–E5433, doi: 10.1073/pnas.1700990114.
 47. Nishie, M., Sasaki, M., Nagao, J., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2011) Lantibiotic transporter requires cooperative functioning of the peptidase domain and the ATP binding domain, *J. Biol. Chem.*, **286**, 11163–11169, doi: 10.1074/jbc.M110.212704.
 48. Kuipers, A., Meijer-Wierenga, J., Rink, R., Kluskens, L. D., and Moll, G. N. (2008) Mechanistic dissection of the enzyme complexes involved in biosynthesis of lactacin 3147 and nisin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6591–6597, doi: 10.1128/AEM.01334-08.
 49. Caetano, T., Barbosa, J., Moesker, E., Sussmuth, R. D., and Mendo, S. (2014) Bioengineering of lanthipeptides in *Escherichia coli*: assessing the specificity of lichenicidin and

- haloduracin biosynthetic machinery, *Res. Microbiol.*, **165**, 600-604, doi: 10.1016/j.resmic.2014.07.006.
50. Galvin, M., Hill, C., and Ross, R. P. (1999) Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays, *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 355-358, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00550.x.
 51. Oman, T. J., and van der Donk, W. A. (2009) Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin, *ACS Chem. Biol.*, **4**, 865-874, doi: 10.1021/cb900194x.
 52. Xin, B., Zheng, J., Xu, Z., Li, C., Ruan, L., Peng, D., and Sun, M. (2015) Three novel lantibiotics, ticans A1, A3, and A4, have extremely stable properties and are promising food biopreservatives, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 6964-6972, doi: 10.1128/aem.01851-15.
 53. Crowther, G. S., Baines, S. D., Todhunter, S. L., Freeman, J., Chilton, C. H., and Wilcox, M. H. (2013) Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an in vitro human gut model of *Clostridium difficile* infection, *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 168-176, doi: 10.1093/jac/dks359.
 54. Louie, T. J., Emery, J., Krulicki, W., Byrne, B., and Mah, M. (2009) OPT-80 eliminates *Clostridium difficile* and is sparing of bacteroides species during treatment of *C. difficile* Infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 261-263, doi: 10.1128/aac.01443-07.
 55. Knerr, P. J., and van der Donk, W. A. (2012) Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides, *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 479-505, doi: 10.1146/annurev-biochem-060110-113521.
 56. Kodani, S., Hudson, M. E., Durrant, M. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. R., and Willey, J. M. (2004) The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11448-11453, doi: 10.1073/pnas.0404220101.
 57. Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., et al. (2010) Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 1151-1154, doi: 10.1002/anie.200905773.
 58. Krawczyk, B., Enslé, P., Müller, W. M., and Süssmuth, R. D. (2012) Deuterium labeled peptides give insights into the directionality of class III lantibiotic synthetase LabKC, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9922-9925, doi: 10.1021/ja3040224.
 59. Muller, W. M., Schmiederer, T., Enslé, P., and Süssmuth, R. D. (2010) In vitro biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic labyrinthopeptin A2 including formation of a C-C bond as a post-translational modification, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 2436-2440, doi: 10.1002/anie.200905909.
 60. Völler, G. H., Krawczyk, J. M., Pesic, A., Krawczyk, B., Nachtigall, J., and Süssmuth, R. D. (2012) Characterization of new class III lantibiotics—erythreapeptin, avermipeptin and griseopeptin from *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces griseus* demonstrates stepwise N-terminal leader processing, *Chembiochem*, **13**, 1174-1183, doi: 10.1002/cbic.201200118.
 61. Iorio, M., Sasso, O., Maffioli, S. I., Bertorelli, R., Monciardini, P., et al. (2014) A glycosylated, labionin-containing lantipeptide with marked antinociceptive activity, *ACS Chem. Biol.*, **9**, 398-404, doi: 10.1021/cb400692w.
 62. Chen, S., Xu, B., Chen, E., Wang, J., Lu, J., Donadio, S., Ge, H., and Wang, H. (2019) Zn-dependent bifunctional proteases are responsible for leader peptide processing of class III lantipeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2533-2538, doi: 10.1073/pnas.1815594116.
 63. Kodani, S., Lodato, M. A., Durrant, M. C., Picart, F., and Willey, J. M. (2005) SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes, *Mol. Microbiol.*, **58**, 1368-1380, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04921.x.
 64. Ferir, G., Petrova, M. I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., et al. (2013) The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications, *PLoS One*, **8**, e64010, doi: 10.1371/journal.pone.0064010.
 65. Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M. J., and van der Donk, W. A. (2010) Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights, *PLoS Biol.*, **8**, e1000339, doi: 10.1371/journal.pbio.1000339.
 66. Zhang, Q., Doroghazi, J. R., Zhao, X., Walker, M. C., and van der Donk, W. A. (2015) Expanded natural product diversity revealed by analysis of lantipeptide-like gene clusters in actinobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 4339-4350, doi: 10.1128/AEM.00635-15.
 67. Iftime, D., Jasyk, M., Kulik, A., Imhoff, J. F., Stegmann, E., Wohlleben, W., Süssmuth, R. D., and Weber, T. (2015) Streptocollin, a type IV lantipeptide produced by *Streptomyces collinus* Tü 365, *Chembiochem.*, **16**, 2615-2623, doi: 10.1002/cbic.201500377.
 68. Hegemann, J. D., and van der Donk, W. A. (2018) Investigation of substrate recognition and biosynthesis in class IV lantipeptide systems, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 5743-5754, doi: 10.1021/jacs.8b01323.
 69. Rogers, L. A. (1928) The inhibiting effect of Streptococcus Lactis on Lactobacillus Bulgaricus, *J. Bacteriol.*, **16**, 321-325, doi: 10.1128/JB.16.5.321-325.1928.
 70. Mattick, A. T. R., Hirsch, A., and Berridge, N. J. (1947) Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci, *Lancet*, **250**, 5-8, doi: 10.1016/S0140-6736(47)90004-4.
 71. van Heijenoort, Y., Gomez, M., Derrien, M., Ayala, J., and van Heijenoort, J. (1992) Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of *Escherichia coli*: possible roles of PBP 1b and PBP 3, *J. Bacteriol.*, **174**, 3549-3557, doi: 10.1128/jb.174.11.3549-3557.1992.
 72. Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006) Lipid II as a target for antibiotics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 321-323, doi: 10.1038/nrd2004.
 73. Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2009) A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus species*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 546-551, doi: 10.1093/jac/dkp221.
 74. Dischinger, J., Basi Chipalu, S., and Bierbaum, G. (2014) Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care, *Int. J. Med. Microbiol.*, **304**, 51-62, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003.
 75. Hsu, S.-T. D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A. G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. J. J., and van Nuland, N. A. J. (2004) The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 963-967, doi: 10.1038/nsmb830.
 76. Hasper, H. E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2004) Assembly and stability of nisin-lipid II pores, *Biochemistry*, **43**, 11567-11575, doi: 10.1021/bi049476b.
 77. Märki, F., Hänni, E., Fredenhagen, A., and van Oostrum, J. (1991) Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2,

- Biochem. Pharmacol.*, **42**, 2027–2035, doi: 10.1016/0006-2952(91)90604-4.
78. Vance, J. E., and Tasseva, G. (2013) Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1831**, 543–554, doi: 10.1016/j.bbailip.2012.08.016.
79. Gbaguidi, B., Hakizimana, P., Vandenbussche, G., and Ruyschaert, J. M. (2007) Conformational changes in a bacterial multidrug transporter are phosphatidylethanolamine-dependent, *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1571–1582, doi: 10.1007/s00018-007-7031-0.
80. Epanand, R. M., and Epanand, R. F. (2009) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 289–294, doi: 10.1016/j.bbammem.2008.08.023.
81. Vestergaard, M., Berglund, N. A., Hsu, P. C., Song, C., Koldso, H., Schiott, B., and Sansom, M. S. P. (2019) Structure and dynamics of cinnamycin-lipid complexes: mechanisms of selectivity for phosphatidylethanolamine lipids, *ACS Omega*, **4**, 18889–18899, doi: 10.1021/acsomega.9b02949.
82. Choung, S. Y., Kobayashi, T., Takemoto, K., Ishitsuka, H., and Inoue, K. (1988) Interaction of a cyclic peptide, Ro09-0198, with phosphatidylethanolamine in liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **940**, 180–187, doi: 10.1016/0005-2736(88)90193-9.
83. Hasim, S., Allison, D. P., Mendez, B., Farmer, A. T., Pelletier, D. A., Retterer, S. T., Campagna, S. R., Reynolds, T. B., and Doktycz, M. J. (2018) Elucidating duramycin's bacterial selectivity and mode of action on the bacterial cell envelope, *Front. Microbiol.*, **9**, 219, doi: 10.3389/fmicb.2018.00219.
84. Jones, A. M., and Helm, J. M. (2009) Emerging treatments in cystic fibrosis, *Drugs*, **69**, 1903–1910, doi: 10.2165/11318500-000000000-00000.
85. Elvas, F., Stroobants, S., and Wyffels, L. (2017) Phosphatidylethanolamine targeting for cell death imaging in early treatment response evaluation and disease diagnosis, *Apoptosis*, **22**, 971–987, doi: 10.1007/s10495-017-1384-0.
86. Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K., and Umeda, M. (1996) Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12867–12872, doi: 10.1073/pnas.93.23.12867.
87. Zhao, M. (2011) Lantibiotics as probes for phosphatidylethanolamine, *Amino acids*, **41**, 1071–1079, doi: 10.1007/s00726-009-0386-9.
88. Hofmann, F. T., Szostak, J. W., and Seebeck, F. P. (2012) *In vitro* selection of functional lantipeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 8038–8041, doi: 10.1021/ja302082d.
89. Zhou, X. X., Li, W. F., Ma, G. X., and Pan, Y. J. (2006) The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements, *Biotechnol. Adv.*, **24**, 285–295, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.001.
90. Aso, Y., Nagao, J.-I., Koga, H., Okuda, K.-I., Kanemasa, Y., Sashihara, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2004) Heterologous expression and functional analysis of the gene cluster for the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1, *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 429–436, doi: 10.1016/S1389-1723(05)00308-7.
91. Böttiger, T., Schneider, T., Martnez, B., Sahl, H.-G., and Wiedemann, I. (2009) Influence of Ca²⁺ ions on the activity of lantibiotics containing a mersacidin-like lipid II binding motif, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4427–4434, doi: 10.1128/aem.00262-09.
92. Li, Y. (2011) Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review, *Protein Expr. Purif.*, **80**, 260–267, doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001.
93. Mesa-Pereira, B., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2018) Heterologous expression of biopreservative bacteriocins with a view to low cost production, *Front. Microbiol.*, **9**, 1654, doi: 10.3389/fmicb.2018.01654.
94. Si, T., Tian, Q., Min, Y., Zhang, L., Sweedler, J. V., van der Donk, W. A., and Zhao, H. (2018) Rapid screening of lanthipeptide analogs via in-colony removal of leader peptides in *Escherichia coli*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 11884–11888, doi: 10.1021/jacs.8b05544.
95. Geng, M., and Smith, L. (2018) Modifying the lantibiotic mutacin 1140 for increased yield, activity, and stability, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, doi: 10.1128/AEM.00830-18.
96. Field, D., Connor, P. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2008) The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens, *Mol. Microbiol.*, **69**, 218–230, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06279.x.
97. Yoganathan, S., Sit, C. S., and Vederas, J. C. (2011) Chemical synthesis and biological evaluation of gallidermin-siderophore conjugates, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2133–2141, doi: 10.1039/c0ob00846j.
98. Li, Q., Montalban-Lopez, M., and Kuipers, O. P. (2018) Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against gram-negative pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, doi: 10.1128/AEM.00052-18.
99. Yang, X., Lennard, K. R., He, C., Walker, M. C., Ball, A. T., Doigneaux, C., Tavassoli, A., and van der Donk, W. A. (2018) A lanthipeptide library used to identify a protein–protein interaction inhibitor, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 375–380, doi: 10.1038/s41589-018-0008-5.
100. Nixon, A. E., Sexton, D. J., and Ladner, R. C. (2014) Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice, *MABs*, **6**, 73–85, doi: 10.4161/mabs.27240.
101. Urban, J. H., Moosmeier, M. A., Aumuller, T., Thein, M., Bosma, T., et al. (2017) Phage display and selection of lanthipeptides on the carboxy-terminus of the gene-3 minor coat protein, *Nat. Commun.*, **8**, 1500, doi: 10.1038/s41467-017-01413-7.
102. Hetrick, K. J., Walker, M. C., and van der Donk, W. A. (2018) Development and application of yeast and phage display of diverse lanthipeptides, *ACS Cent. Sci.*, **4**, 458–467, doi: 10.1021/acscentsci.7b00581.
103. Convery, N., and Gadegaard, N. (2019) 30 years of microfluidics, *Micro and Nano Engineering*, **2**, 76–91, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.003.
104. Fallah-Araghi, A., Baret, J. C., Ryckelynck, M., and Griffiths, A. D. (2012) A completely in vitro ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution, *Lab. Chip.*, **12**, 882–891, doi: 10.1039/c2lc21035e.
105. Mahler, L., Wink, K., Beulig, R. J., Scherlach, K., Tovar, M., et al. (2018) Detection of antibiotics synthesized in microfluidic picolitre-droplets by various actinobacteria, *Sci. Rep.*, **8**, 13087, doi: 10.1038/s41598-018-31263-2.
106. Terekhov, S. S., Smirnov, I. V., Stepanova, A. V., Bobik, T. V., Mokrushina, Y. A., et al. (2017) Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2550–2555, doi: 10.1073/pnas.1621226114.

ENGINEERING ARTIFICIAL BIODIVERSITY OF LANTIBIOTICS TO EXPAND THE CHEMICAL SPACE OF DNA-ENCODED ANTIBIOTICS

Review

S. O. Pipiya¹, S. S. Terekhov^{1,2}, Yu. A. Mokrushina^{1,2},
V. D. Knorre¹, I. V. Smirnov^{1,2*}, and A. G. Gabibov^{1,2}

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: smirnov@ibch.ru*

² *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received August 11, 2020

Revised September 28, 2020

Accepted October 7, 2020

The discovery of antibiotics was one of the fundamental stages in the development of humanity, leading to a dramatic increase in the life expectancy of millions of people all over the world. The uncontrolled use of antibiotics resulted in the selection of resistant strains of bacteria, limiting the effectiveness of antimicrobial therapy nowadays. Antimicrobial peptides (AMPs) were considered promising candidates for next-generation antibiotics for a long time. However, the practical application of AMPs is restricted by their low therapeutic indices, impaired pharmacokinetics, and pharmacodynamics, which is predetermined by their peptide structure. Nevertheless, the DNA-encoded nature of AMPs enables creating broad repertoires of artificial biodiversity of antibiotics, making them versatile templates for the directed evolution of antibiotic activity. Lantibiotics are a unique class of AMPs with an expanded chemical space. A variety of post-translational modifications, mechanisms of action on bacterial membranes, and DNA-encoded nature make them a convenient molecular template for creating highly representative libraries of antimicrobial compounds. Isolation of new drug candidates from this synthetic biodiversity is extremely attractive but requires high-throughput screening of antibiotic activity. The combination of synthetic biology and ultrahigh-throughput microfluidics allows implementing the concept of directed evolution of lantibiotics for accelerated creation of new promising drug candidates.

Keywords: directed evolution of antimicrobial activity, DNA-encoded antibiotics, ultrahigh-throughput screening, microfluidics, lantibiotic bioengineering, drug discovery, antibiotic resistance