

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Антибиотики. Боттромацин A₂ (BotA2) и карбоновая кислота боттромацина A₂ (BotCA) были любезно предоставлены профессором Рольфом Мюллером и доктором Джой Биркельбах из Института фармацевтических исследований имени Гельмгольца в Сааре и Центра по исследованию инфекционных заболеваний имени Гельмгольца (Германия) в качестве стандартов. BotA2 и BotCA, используемые в экспериментах, были очищены из культуральной жидкости штамма-продуцента *Streptomyces* sp. VKM Ac-2945^T, как описано ниже. Оба соединения растворяли в 50%-ном водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) до конечной концентрации 20 мМ. Мупироцин (Mur) приобретали в аптеке. Эритромицин (Ery), хлорамфеникол (Chl), левофлоксацин (Lev), тиострептон (Ths), боррелидин (Borr), циклогексимид (Chx), канамицин (Kan), рифампицин (Rif), стрептомицин (Str) и кирромицин (Kirr), используемые в качестве препаратов сравнения, были приобретены в компании «Sigma-Aldrich», США. Тетраценомицин X (TcmX) был очищен из культуральной жидкости штамма *Amycolatopsis* sp. A23, как описано ранее [1]. Микроцин С (McC) был очищен согласно опубликованной методике [2].

Выделение и очистка BotA2 и BotCA. Препаративную ОФ-ВЭЖХ проводили на хроматографе puriFlash[®] PF-4250 («Interchim», Франция), оснащённом колонкой VDSpher 100 C18-E (10 мкм, 20 × 250 мм) («VDS optilab», Германия). Детекция осуществлялась по поглощению на длинах волн 205 и 254 нм. В качестве элюента А использовали 0,1%-ный раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) (HPLC grade, «Fisher Scientific», Великобритания) в воде; в качестве элюента В использовали ацетонитрил (HPLC gradient grade, «Fisher Scientific») с добавлением 0,1%-ного ТФУ. Для очистки воды применяли систему HyperPureX («Hyperpurex Instrument Technology», Китай). Скорость потока при хроматографии составляла 20 мл/мин. Для BotCA применялась программа элюирования 0–25–28–33 мин, 29–29–95–95% В, время удерживания целевого компонента составило 24,5 мин. Для BotA2 применялась программа элюирования 0–15–25–30 мин, 30–40–95–95% В, время удерживания целевого компонента составило 19,3 мин (рис. П1).

Выделенные соединения были идентифицированы с помощью аналитической ВЭЖХ путём сравнения со стандартными образцами BotA2 и BotCA, а также на основании масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР). Аналитическую ОФ-ВЭЖХ проводили с использованием системы Agilent 1100 («Agilent Technologies», США) с четвертичным насосом, оснащённой колонкой Ultisil XB-C18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм) («Welch Materials», Китай) и соответствующей предколонкой Ultisil XB-C18 (5 мкм, 4,6 × 20 мм) («Welch Materials»). В качестве элюента А использовалась вода; в качестве элюента В – ацетонитрил; в качестве элюента С – 2%-ный водный раствор ТФУ. Для BotA2 применялся метод анализа 0–10–12–14 мин, 40–70–95–95% В, с постоянным добавлением 5% С, время удерживания BotA2 составило 6,9 мин. Для BotCA, использовался метод анализа 0–30–31–34 мин, 29–29–95–95% В, с постоянным добавлением 5% С, время удерживания BotCA составило 22,6 мин. Идентичность соединений была также подтверждена по результатам ВЭЖХ-МСВР анализа, проведённого с использованием гибридного масс-спектрометра Orbitrap Exploris 240 и ВЭЖХ

Vanquish («Thermo Fisher Scientific», США). Анализ проводили на колонке с обращённо-фазовым сорбентом Acclaim™ 120 C18 (2,2 мкм, 2,1 × 150 мм, «Dionex», США). Компоненты подвижной фазы: А – 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, В – 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Температура термостата колонки – 45 °С. Скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. Программа градиента элюирования: 0–3 мин, 5% В; 3–17 мин, 5–95% В; 17–21 мин, 95% В; 21–22 мин, 95–5% В. Температура блока автосэмплера – 4 °С, объём ввода образца – 10 мкл. Масс-спектрометрическое детектирование проводилось при регистрации положительных и отрицательных ионов по отдельности. Параметры источника электрораспылительной ионизации: напряжение – 3500 В для положительных ионов или 2500 В для отрицательных ионов; потоки газов в камере ионизации – 50/10/1 отн. ед.; температура ион-проводящего капилляра – 325 °С; температура газа распылителя – 350 °С. Диапазон сканирования спектров первого поколения – от 150 до 2000 *m/z*, разрешение – 30 000, напряжение на RF-линзе – 70%. Накопление спектров фрагментации производилось в информационно-зависимом режиме с использованием параметров динамического исключения для выбора ионов прекурсоров. Окно изоляции – 1 *m/z*, энергия фрагментации – последовательное применение 15%, 30%, 45% и 60%. AGC – 200%, выбор времени накопления – автоматический.

Бактериальные штаммы и условия их культивирования. Штамм *Escherichia coli* BW25113, содержащий частичную делецию гена *lptD*, кодоны 330–352 (обозначенный в работе как *E. coli lptD^{mut}*), был любезно предоставлен доктором А.С. Манькиным из Иллинойского университета, США [3]. Штамм *E. coli* JW5503-Kan^R, несущий делецию гена *tolC* (обозначенный в работе как *E. coli ΔtolC*), был получен из штамма *E. coli* JW5503 путём удаления кассеты устойчивости к канамицину с помощью рекомбинации по опубликованной методике [4]. Штаммы *E. coli* JW5503 и *E. coli* BW25113 были любезно предоставлены профессором Хиронори Ники из Национального института генетики, Япония [5]. Клетки *E. coli* *ΔtolC* были трансформированы плазмидами рJC27, кодирующими нативный или мутантный ген *lacZ* [6]. Мутантные варианты гена *lacZ* кодировали следующие аминокислотные замены каталитического остатка β-галактозидазы: Glu537Asp (GAA → GAC), Glu537Gly (GAA → GGA/GGG), соответствующие плазмидам рJC27-GAC, рJC27-GGA и рJC27-GGG.

Штамм *E. coli* SQ110 с делецией шести оперонов рPHK (кроме оперона *rrnE*) и гена *tolC* (обозначенный в работе как SQ110 *ΔtolC*) был любезно предоставлен доктором А.С. Манькиным [3]. Мутанты, устойчивые к хлорамфениколу, эритромицину или обоим антибиотикам, были отобраны с использованием штамма SQ110 *ΔtolC*, согласно ранее описанной методике [1]. Штамм *E. coli* SQ171 с делецией всех семи оперонов рPHK и гена *tolC* (обозначенный в работе как SQ171 *ΔtolC*), трансформированный плазмидой рCSacB (Kan^R), которая несёт оперон *rrnB* дикого типа, был любезно предоставлен доктором А.С. Манькиным [7, 8]. Плазмида рCSacB (Kan^R) была впоследствии заменена плазмидой рLK35 (Amp^R) или рAM552 (Amp^R), кодирующей либо нативный (WT), либо мутированный оперон *rrnB*, согласно ранее описанной процедуре [1].

Штамм *Bacillus subtilis* 168 был любезно предоставлен С.С. Тереховым из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Россия. Штаммы *B. subtilis* 168 pHT01-cat и *B. subtilis* 168 pHT01-cfr были получены, как описано ранее [9].

Если не указано иное, все вышеупомянутые штаммы бактерий культивировали при температуре 37 °С в среде LB по Miller с добавлением селективных антибиотиков при необходимости. Клетки *E. coli lptD^{mut}* и *E. coli ΔtolC*, трансформированные плазмидами pJC27, растили в присутствии 10 мкг/мл хлорамфеникола. Штаммы SQ110 ΔtolC растили в присутствии 50 мкг/мл канамицина. Штаммы SQ171 ΔtolC pLK35 и SQ171 ΔtolC pAM552 растили в присутствии 100 мкг/мл ампициллина. *B. subtilis* 168 pHT01-cat растили в присутствии 5 мкг/мл хлорамфеникола. *B. subtilis* 168 pHT01-cfr растили в присутствии 3 мкг/мл хлорамфеникола. Остальные штаммы бактерий культивировали без антибиотиков.

Метод диффузии в агар на панели штаммов *E. coli*, устойчивых к антибиотикам за счёт мутаций в гене 23S рПНК. Ночные культуры клеток SQ110 ΔtolC и SQ171 ΔtolC, выращенные в присутствии селективных антибиотиков, высевали на 1.5%-ную среду LB-агар по Miller с добавлением 50 мкг/мл канамицина или 100 мкг/мл ампициллина соответственно, и оставляли на некоторое время для высыхания до следующего этапа. Далее на поверхность агаризированной среды, покрытой клетками SQ110 ΔtolC или SQ171 ΔtolC, наносили следующие антибиотики: эритромицин (Ery, 5 мг/мл), левофлоксацин (Lev, 25 мкг/мл), тетраценомицин X (TcmX, 5 мг/мл), хлорамфеникол (Chl, 2 мг/мл). В центре каждой чашки Петри вырезали лунку из слоя среды и заполняли её 50 мкл 1 мМ BotA2, растворённого в 30%-ном водном растворе ацетонитрила. Чашки с клетками инкубировали в течение ночи при 37 °С и сканировали с помощью системы визуализации ChemiDoc™ («Bio-Rad Laboratories», США) с использованием канала «Cy5-blot» (фильтр эмиссии 695 ± 50 нм). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab™ (версия 6.0.1, «Bio-Rad Laboratories»).

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Значения МИК определяли с помощью стандартного метода микроразведений в жидкой среде [10] с использованием 96-луночных стерильных планшетов в объёме по 100 мкл среды на лунку. Стоковые растворы антибиотиков разводили в соотношении 1 : 50 в 100 мкл свежей среды LB. Затем готовили двукратные серийные разведения и в каждую лунку добавляли равный объём (по 50 мкл) суспензии бактериальных клеток в логарифмической фазе роста, предварительно разбавленных средой LB в соотношении 1 : 100. Планшеты инкубировали в течение ночи (16–20 ч) при 37 °С и постоянном перемешивании со скоростью 200 об./мин (шейкер-инкубатор ES-20/80, «BioSan», Латвия). Рост клеток оценивали путем сканирования OD₆₀₀ с помощью многофункционального планшетного анализатора VICTOR X5 («PerkinElmer», США).

In vitro трансляция в бактериальной бесклеточной системе. Препарат мПНК, кодирующей люциферазу светлячка (Fluc, от англ. firefly luciferase), был получен с использованием набора реагентов для *in vitro* транскрипции MEGAscript™ T7 Transcription Kit («Thermo Fisher Scientific»), согласно протоколу производителя. Реакции трансляции проводили в объёме 3 мкл с помощью

набора PURExpress® In vitro Protein Synthesis Kit («New England BioLabs», США), в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве альтернативы, реакции проводили в объеме 5 мкл с использованием реактивов *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates («Promega», США), в соответствии с инструкциями производителя. В каждую реакцию добавляли 2 ед. ингибитора РНКаз RiboLock («Thermo Fisher Scientific»), 0,17 мМ натриевую соль D-люциферина («Sigma-Aldrich»), 60 нг мРНК Fluc и водный раствор антибиотика или воды, свободную от нуклеаз, в качестве положительного контроля. Стоковые растворы антибиотиков в ДМСО разводили водой без нуклеаз до 10-кратных финальных концентраций непосредственно перед экспериментом. Перед добавлением мРНК пробирки с реакционными смесями предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем снова переносили в лед. После добавления мРНК реакционные смеси переносили в 384-луночный белый планшет. Хемилюминесценцию непрерывно измеряли на приборе VICTOR X5 Multilabel Plate Reader при 37 °С в течение 1 часа. В качестве меры эффективности трансляции для каждой реакции были определены максимальные значения скорости накопления Fluc как приращение единиц интенсивности света в секунду. Полученные значения нормировали на соответствующие значения для положительного контроля (воды без нуклеаз), которому присваивалось значение эффективности трансляции 100%. Значения IC₅₀, при которых эффективность трансляции была снижена на 50%, были рассчитаны с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 10.1.2, «Dotmatics», США).

***In vitro* трансляция в эукариотической бесклеточной системе.** Трансляционный лизат получали из клеток линии HEK293T, как описано ранее [11], но с небольшими изменениями: собранные клетки не обрабатывали буфером, содержащим лизолецитин. Вместо этого их сразу суспендировали в равном объеме охлажденного гипотонического буфера для экстракции (20 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 10 мМ KOAc, 1 мМ Mg(OAc)₂, 4 мМ DTT, смесь ингибиторов протеаз без EDTA с Omplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail («Roche», Швейцария)), инкубировали 5 мин на льду, после чего клетки разрушали в узком гомогенизаторе Даунса за 20–25 ударов. Лизат очищали от клеточного дебриса центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 g и 4 °С. Аликвоты лизата замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

Реакции трансляции проводили в объеме 10 мкл, содержащем 5 мкл полученного лизата из клеток HEK293T, 1 мкл 10-кратного буфера для трансляции (200 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), 80 мМ креатинфосфат, 10 мМ DTT, 5 мМ спермидин-HCl, 10 мМ ATP, 2 мМ GTP, 1 мМ KOAc, 10 мМ Mg(OAc)₂, 0,25 мМ каждой аминокислоты), 2 ед. креатинфосфокиназы из мышц кролика («Sigma-Aldrich»), 2 ед. ингибитора РНКаз RiboLock, 0,5 мМ натриевую соль D-люциферина, 1 мкл водного раствора антибиотика или воды, свободной от нуклеаз, в качестве положительного контроля, и 100 нг m⁷G-кэпированной и полиаденилированной мРНК Fluc с 5'-НТО (5'-нетранслируемой областью) гена β-актина. Препарат мРНК был получен с использованием набора реагентов для проведения T7-транскрипции из mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transcription Kit («Thermo Fisher Scientific») и добавлен в виде 1 мкл водного раствора к трансляционным смесям после того, как их преинкубировали в течение 5 мин при 30 °С. Затем смеси переносили в предварительно прогретый

до 30 °С 384-луночный белый планшет, покрытый прозрачной пленкой для ПЦР-планшетов, и инкубировали в приборе CLARIOstar® Plus Microplate Reader («BMG Labtech», Германия) при 30 °С и непрерывном измерении активности люциферазы. Максимальные скорости накопления Fluc рассчитывали по кинетическим кривым и использовали в качестве меры эффективности трансляции. Далее полученные значения нормировали на соответствующие значения для положительного контроля (воды без нуклеаз), которому присваивалось значение 100%. Изображения с результатами анализа были подготовлены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 10.1.2).

Метод тоупринтинга. ДНК-матрицы (по 0,3 пмоль) экспрессировали в бесклеточной бактериальной системе сопряжённой транскрипции-трансляции с использованием набора реагентов из PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit в объёме по 5 мкл на реакцию, в соответствии с протоколом производителя. Все антибиотики добавляли в реакционные смеси до финальной концентрации 50 мкМ. В образцы с отрицательным контролем (обозначенные как “-”) вместо антибиотиков добавляли воду, свободную от нуклеаз. Перед внесением ДНК-матрицы реакционные смеси преинкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После добавления ДНК-матрицы реакции инкубировали при 37 °С в течение 20 мин, затем добавляли 1 пмоль [³²P]-меченого праймера NV1 или NV2 (Таблица П1) и 2 ед. обратной транскриптазы AMV («Roche»), после чего пробирки с реакционными смесями дополнительно инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Реакции останавливали добавлением 1 мкл 10 М NaOH с последующей инкубацией при 37 °С в течение 15 мин. Далее pH нейтрализовывали и стабилизировали добавлением эквивалентного количества конц. HCl и 200 мкл буфера для ресуспендирования (0,3 М NaOAc (pH 5,5), 5 мМ ЭДТА, 0,5% SDS). После этого образцы подвергали очистке фрагментов кДНК с использованием набора QIAquick® PCR Purification Kit («Qiagen», Германия), согласно протоколу производителя, вместо фенол-хлороформной экстракции, используемой в классическом методе тоупринтинга. Полученные препараты кДНК высушивали при 95 °С и растворяли в 10 мкл красителя для нанесения на гель (98% формамид, 10 мМ ЭДТА (pH 8,0), 0,1% бромфеноловый синий, 0,1% ксиленцианол). Секвенирование ДНК-матриц по методу Сэнгера проводили с использованием набора USB® Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit («Affymetrix», США), согласно протоколу производителя. Препараты кДНК разделяли в 6% ПААГ, содержащем 7 М мочевины и буфер TBE (90 мМ Tris, 90 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 8,3). После электрофореза гель высушивали с помощью вакуумной системы Savant™ Universal Vacuum System Plus (UVS400A, «Thermo Fisher Scientific») при 80 °С в течение 1 часа и экспонировали на экран для детекции радиоактивности в течение ночи. Экран сканировали с помощью прибора Typhoon™ FLA 9500 Biomolecular Imager («GE Healthcare», США) или FujiFilm Fluorescent Image Analyzer FLA-3000 («Fujifilm», Япония). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Image Lab™ (версия 6.0.1).

Подготовка образцов к Toe-seq анализу. Библиотека линейных ДНК-матриц была создана с помощью ПЦР в предыдущей работе [12]. Каждая матрица состоит из T7 промотора, 5'-нетранслируемой области (одной из трёх типов), открытой рамки считывания (ORF, от англ. open

reading frame), содержащей старт-кодон, 30 рандомизированных нуклеотидов и 7 константных кодонов, за которыми следуют 3'-нетранслируемая область (3'-НТО, одна из двух типов) и область баркода. Высокопроизводительное секвенирование (NGS, от англ. next-generation sequencing) библиотеки позволило получить словарь, в котором каждый баркод однозначно соответствует одной последовательности ORF с двумя фланкирующими последовательностями 5'- и 3'-нетранслируемых областей. Библиотека ДНК-матриц была экспрессирована в бактериальной системе сопряжённой транскрипции-трансляции с использованием набора реагентов PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit в присутствии 50 мкМ BotA2. В контрольные реакции вместо BotA2 добавляли воду, свободную от нуклеаз. Все реакции были приготовлены в двух биологических повторах. Далее использовали обратную транскриптазу AMV для синтеза фрагментов кДНК, которые затем очищали и удлиняли по 3'-концу с помощью 5 ед. терминальной трансферазы TdT («New England BioLabs») с добавлением 4 мкМ dATP. Далее осуществляли синтез комплементарной цепи с помощью фрагмента Клёнова (3'→5' экзо-) («New England BioLabs»), согласно протоколу производителя. После этого фрагменты дцДНК дополнительно амплифицировали с помощью высокоточной ПЦР, очищали и готовили из них NGS библиотеки с использованием набора реагентов MGIEasy Universal DNA Library Prep Set («MGI Tech», Китай). Полученные образцы секвенировали на платформе MGISEQ-2000 («MGI Tech») в центре коллективного пользования «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Вычислительная обработка данных Toe-seq. Сырые данные в формате FastQ, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования, были обработаны в соответствии с ранее описанной процедурой [12]. Все вычисления, приведённые ниже, были выполнены с использованием скриптов, написанных на Bash и Python, и ранее составленного словаря. Первым делом мы картировали полученные риды на словарь с целью выявления мРНК, составляющих отсеквенированную библиотеку, и определяли общее число ридов, картированных на эту библиотеку. Далее для каждой мРНК из библиотеки мы рассчитывали количество ридов, заканчивающихся на каждой позиции нуклеотидной последовательности этой мРНК. Риды, заканчивающиеся на 5'-НТО, суммировали и обозначали как значения FL (от англ. full-length, количество полноразмерных фрагментов кДНК). Затем все полученные значения нормировали на подсчитанное общее число картированных ридов в библиотеке и умножали на 10^6 , таким образом получая так называемое количество ридов на миллион (CPM, от англ. counts per million). Чтобы выявить места остановок рибосом в процессе трансляции, мы проводили следующие расчёты для каждого смыслового кодона в ORF: значения CPM, относящиеся к позициям +16, +17 и +18 относительно первого нуклеотида рассматриваемого кодона, суммировали и делили на общее число CPM для рассматриваемой мРНК (обозначено как CPM_{mRNA}). В совокупности полученные значения отражают плотность распределения рибосом вдоль кодирующей последовательности. В данном случае мы определяем остановки рибосом, основываясь на частоте, с которой тот или иной кодон оказывается в Р-сайте рибосомы. Кроме того, все значения CPM, относящиеся к позициям, расположенным между старт-кодоном и старт-кодом +15 нуклеотидов включительно, суммировали с ранее рассчитанными значениями FL и делили на соответствующее значение

CPM_{mRNA} . Далее мы нормировали данные для образцов, обработанных антибиотиком, на данные для контрольных образцов (воды, свободной от нуклеаз) путём вычитания соответствующих плотностей распределения рибосом. Этот шаг дополнительно позволяет нам исключить из дальнейшего рассмотрения неспецифические продукты, синтезированные обратной транскриптазой. Полученные в результате описанных вычислений положительные значения представляют распределение вероятности остановки рибосом (*StallProbability*) вдоль последовательности ORF, в то время как отрицательные значения следует интерпретировать как действительно «невозможные» участки для специфической остановки рибосом, вызванной действием антибиотика. Далее для каждой мРНК мы определяли наиболее вероятное место остановки рибосом (*StallPosition*) как порядковый номер кодона, соответствующего максимальной вероятности остановки (*MaxStallProbability*). В случае мРНК, содержащих преждевременный стоп-кодон, для определения *MaxStallProbability* и *StallPosition* учитывались только значения *StallProbability*, соответствующие смысловым кодонам в ORF до первого встретившегося стоп-кодона. Поскольку точность оценки значения *MaxStallProbability* зависит от покрытия мРНК (обозначенного как CPM_{mRNA}), мы ввели метрику правдоподобия *Likelihood*, которая учитывает достоверность рассчитанной максимальной вероятности остановки рибосом *MaxStallProbability* для каждой мРНК из библиотеки. Эта метрика была определена следующим образом:

$$Likelihood_i = MaxStallProbability_i \cdot 2^{lg\left(\frac{CPM_{mRNA,i} \cdot CPM_{mRNAC,i}}{\sum_j CPM_{mRNA,j} \cdot CPM_{mRNAC,j}}\right)}, \quad (1)$$

где $CPM_{mRNA,i}$ и $CPM_{mRNAC,i}$ обозначают суммарное количество CPM, относящихся к рассматриваемой мРНК (с баркодом i) и полученных из образцов, обработанных и не обработанных антибиотиком соответственно. Стоит отметить, что мы используем метрику *Likelihood* скорее как относительный, а не абсолютный показатель. Аналогичным образом мы ввели еще один параметр под названием *cpmRNAratio*, который отражает сходство в покрытии мРНК между двумя образцами и рассчитывается следующим образом:

$$cpmRNAratio_i = \frac{CPM_{mRNA,i}}{CPM_{mRNAC,i}}, \quad (2)$$

Далее были применены следующие критерии для выявления наиболее правдоподобных сайтов остановки рибосом из полученных наборов данных: (i) показатель *MaxStallProbability* должен быть больше 0, (ii) отношение *cpmRNAratio* должно находиться в пределах межквартильного диапазона (IQR, от англ. interquartile range), (iii) мРНК со значениями CPM_{ORF} , CPM_{mRNAC} и *Likelihood* ниже соответствующего 25-го перцентиля следует удалить. Здесь значение CPM_{ORF} - это суммарное количество CPM, приходящихся на кодирующую область мРНК. Полученные в результате наборы данных использовали для дальнейшего анализа.

Анализ представленности различных аминокислотных остатков среди мотивов остановок рибосом, вызванных боттромаицином A₂. Оба набора данных, полученных после фильтрации, были использованы для определения мотивов остановки рибосом под действием BotA2. Каждой мРНК в библиотеке был сопоставлен мотив, представленный последовательностью из трёх аминокислотных остатков, соответствующих кодонам, занимающим E-, P- и A-сайты остановленных рибосом (остановки определены по показателю *StallPosition*). Мотивы, связанные с остановкой рибосом на старт- и стоп-кодонах, а также на втором кодоне и кодонах 11-17, были исключены из анализа, чтобы ограничиться рассмотрением только варибельной области мРНК. В общей сложности 12 245 мотивов было использовано для pLogo-анализа [13]. Чтобы учесть особенности библиотеки и сделать поправку на частоты сочетаний кодонов, мы извлекли все возможные мотивы, связанные с кодонами 2–4, из тех же библиотек мРНК, полученных до фильтрации данных, и использовали их в качестве фоновых последовательностей при построении pLogo.

Анализ представленности различных кодонов среди сайтов остановок рибосом, вызванных боттромаицином A₂. Каждый набор данных, полученный после фильтрации, был использован для подсчёта относительной встречаемости кодонов в E-, P- и A-сайтах остановленных рибосом. Для расчётов были использованы только сайты с параметром *StallPosition* = 3–10, так как остановки в этих положениях на мРНК соответствуют полностью варибельным кодонам, приходящимся на все три функциональных сайта рибосомы. Полученные значения частот кодонов были впоследствии нормированы на общие частоты кодонов во всей (той же) библиотеке мРНК путём вычитания. Таким образом мы получали значения, отражающие представленность кодонов в E-, P- и A-сайтах остановленных рибосом: положительные значения соответствуют перепредставленным кодонам; отрицательные – недопредставленным.

LC-QTOF-MS-анализ образцов, подготовленных для общего анализа аминокислотирования тРНК. LC-QTOF-MS-анализ проводился с использованием системы Acquity UPLC («Waters», США), подключённой к квадрупольному времяпролётному масс-спектрометру (QTOF-MS, от англ. quadrupole time-of-flight mass spectrometer) maXis Impact II («Bruker Daltonics», Германия), оснащённому источником ионизации электрораспылением. Образец (10 мкл) был полностью растворён в 20 мкл деионизированной воды. Затем 10 мкл раствора вводили в систему LC-QTOF-MS. Хроматографическое разделение проводили при 40 °C, используя бинарный градиент при скорости потока 0,2 мл/мин на колонке Acquity UPLC BEH C18 (1,7 мкм, 2,1 × 100 мм) («Waters») с соответствующей предколонкой Acquity UPLC BEH C18 VanGuard (1,7 мкм, 2,1 × 5 мм) («Waters»). Подвижная фаза состояла из 5 мМ раствора (NH₄)OAc (pH 5,2) в воде (элюент А), и 5 мМ раствора (NH₄)OAc (pH 5,2) в 90% ацетонитриле (MeCN) (элюент В). Программа ступенчатого линейного градиента: 0–3 мин 2% MeCN, 3–28 мин градиент от 2% до 40% MeCN, 28–30 мин градиент от 40% до 80% MeCN, 30–35 мин 80% MeCN, 35–37 мин градиент от 80% до 2% MeCN, 37–40 мин 2% MeCN. Масс-спектрометр использовали в режиме регистрации положительных ионов. Хроматограммы общего ионного тока были получены при следующих настройках: давление в распылителе 1,8 атм,

расход осушающего газа 5 л/мин и температура осушающего газа 180 °С. Масс-спектрометр калибровали ежедневно с помощью внешнего калибровочного стандарта ES Tuning Mix («Agilent Technologies»). Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Compass DataAnalysis (версия 4.3, «Bruker Daltonics»).

Метод диффузии в агар с применением репортёрных систем на ошибки трансляции.

Клетки штамма *E. coli ΔtolC*, трансформированные репортёрными системами на основе плазмиды pJC27, использовали согласно ранее описанной методике [14]. Вкратце, ночную культуру штамма *E. coli ΔtolC* pJC27 разводили в соотношении 1 : 8 в 4 мл теплой (50 °С) 0,6%-ной среды LB-агар с добавлением 10 мкг/мл хлорамфеникола. После непродолжительного перемешивания суспензию клеток выливали на поверхность чашки Петри (диаметр 9 см), заполненной 1,5%-ной средой LB-агар с добавлением 10 мкг/мл хлорамфеникола и 80 мкг/мл субстрата X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактопиранозид). Как только верхний слой LB-агара с клетками застывал, на его поверхность наносили по 1 мкл следующих растворов тестируемых антибиотиков: канамицин (Kan, 5 мг/мл), рифампицин (Rif, 10 мг/мл), стрептомицин (Str, 5 мг/мл), карбоновая кислота боттромицина A₂ (BotCA, 20 мМ) и боттромицин A₂ (BotA2, 20 мМ; (●), 500 мкМ). Чашки инкубировали ночь при 37 °С и затем фотографировали на камеру.

Выделение и очистка тРНК^{Gly}. Суммарную тРНК из клеток *E. coli* подвергали аминоацилированию 0,5 мМ глицином при 37 °С в течение 30 мин с использованием 5%-ного экстракта S100. К полученному препарату аминоацил-тРНК добавляли двукратный избыток EF-Tu·GTP для образования тройного комплекса (aa-тРНК·EF-Tu·GTP) при 37 °С в течение 5 мин. Далее тройной комплекс очищали с помощью колонки Protino[®] Ni-IDA объемом 1 мл («Macherey-Nagel», Германия), в соответствии с инструкциями производителя. Элюированный тройной комплекс диссоциировали добавлением KOAc (pH 5,0) до конечной концентрации 0,2 М, после чего aa-тРНК экстрагировали фенолом и осаждали этанолом. Осадок тРНК растворяли в ddH₂O и хранили при – 80 °С.

Сборка инициаторного и тройного комплексов. Для стандартной реакции образования инициаторного комплекса 1 мкМ 70S рибосомы инкубировали с 5 мкМ мРНК, 2 мкМ fMet-тРНК^{fMet} или 1,5 мкМ BODIPY-Met-тРНК^{fMet}, 1,5 мкМ IF1, IF2 и IF3 в буфере TAKM₇ с добавлением 1 мМ GTP и 2 мМ DTT при 37 °С в течение 1 часа. Тройной комплекс aa-тРНК·EF-Tu·GTP получали путем предварительной инкубации EF-Tu с 1 мМ GTP, 3 мМ фосфоенолпируватом, 2 мМ DTT, 1%-ной пируваткиназой в буфере TAKM₇ при 37 °С в течение 15 мин с последующим добавлением aa-тРНК и инкубацией в течение 5 мин при 37 °С.

Получение препарата деацелированной суммарной тРНК. Суммарную тРНК выделяли из культуры клеток *E. coli* BW25113 с помощью набора для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента «Ли́ра» («Биолабмикс», Россия), в соответствии с протоколом производителя. Затем очищенную тРНК обрабатывали 1 ед. ДНКазы I, свободной от РНКаз (1 ед./мкл) («Thermo Fisher Scientific»), в буфере, содержащем 40 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 6 мМ MgCl₂. Реакции инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. После экстракции фенолом, насыщенным 0,1 М цитратным буфером (pH

4,3), и осаждения изопропанолом препарат тРНК подвергали деацилированию путём инкубации в 0,1 М Tris-HCl (pH 9,0) при 37 °С в течение 45 мин. Затем pH раствора понижали добавлением 3 М NaOAc (pH 4,5) до конечной концентрации 0,3 М. После повторного осаждения тРНК изопропанолом осадок растворяли в воде, свободной от нуклеаз, и дважды диализовали против 1000-кратного объёма воды.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РИСУНКИ

Рисунок П1. Очистка BotA2 и BotCA с помощью ОФ-ВЭЖХ

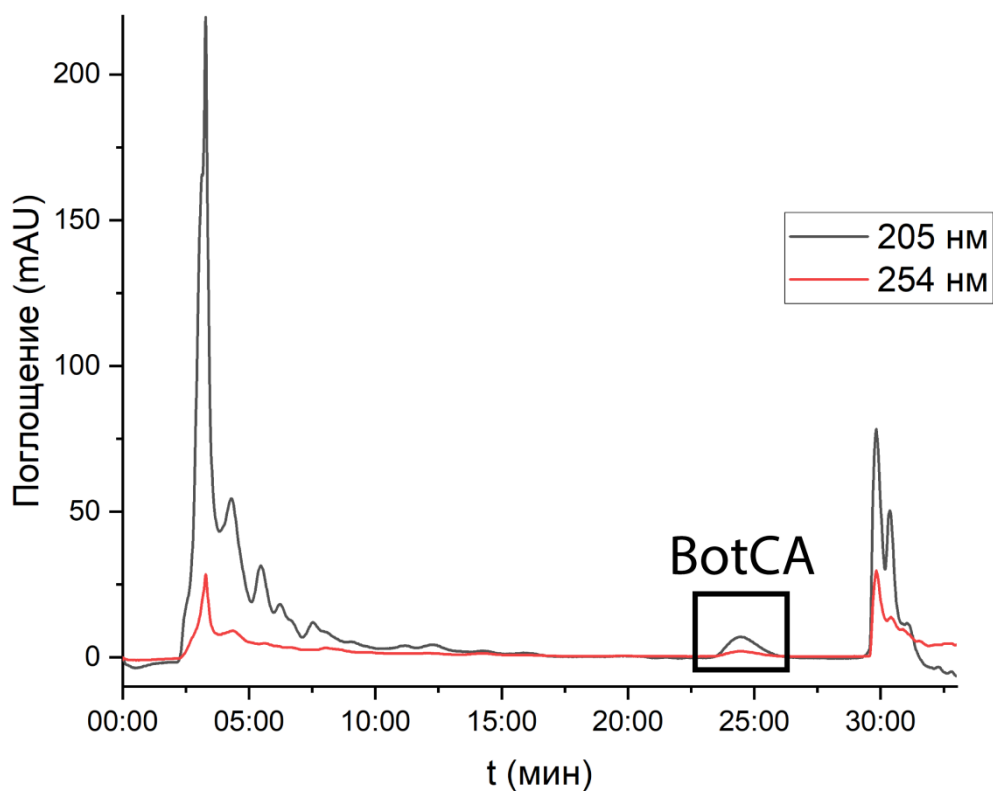
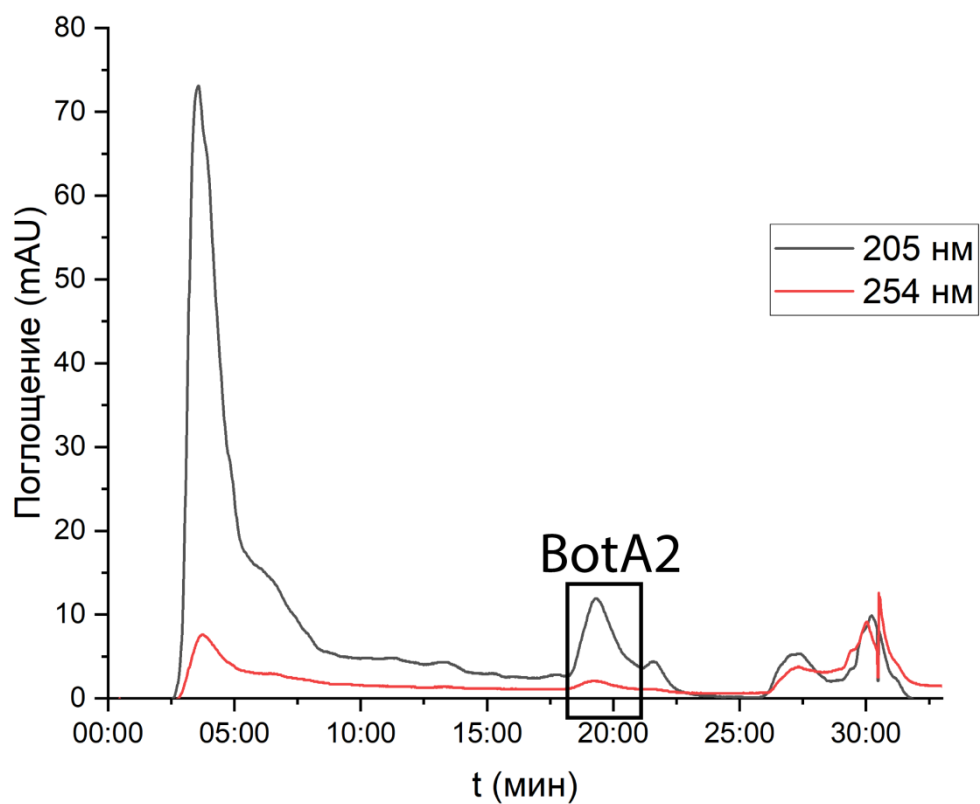
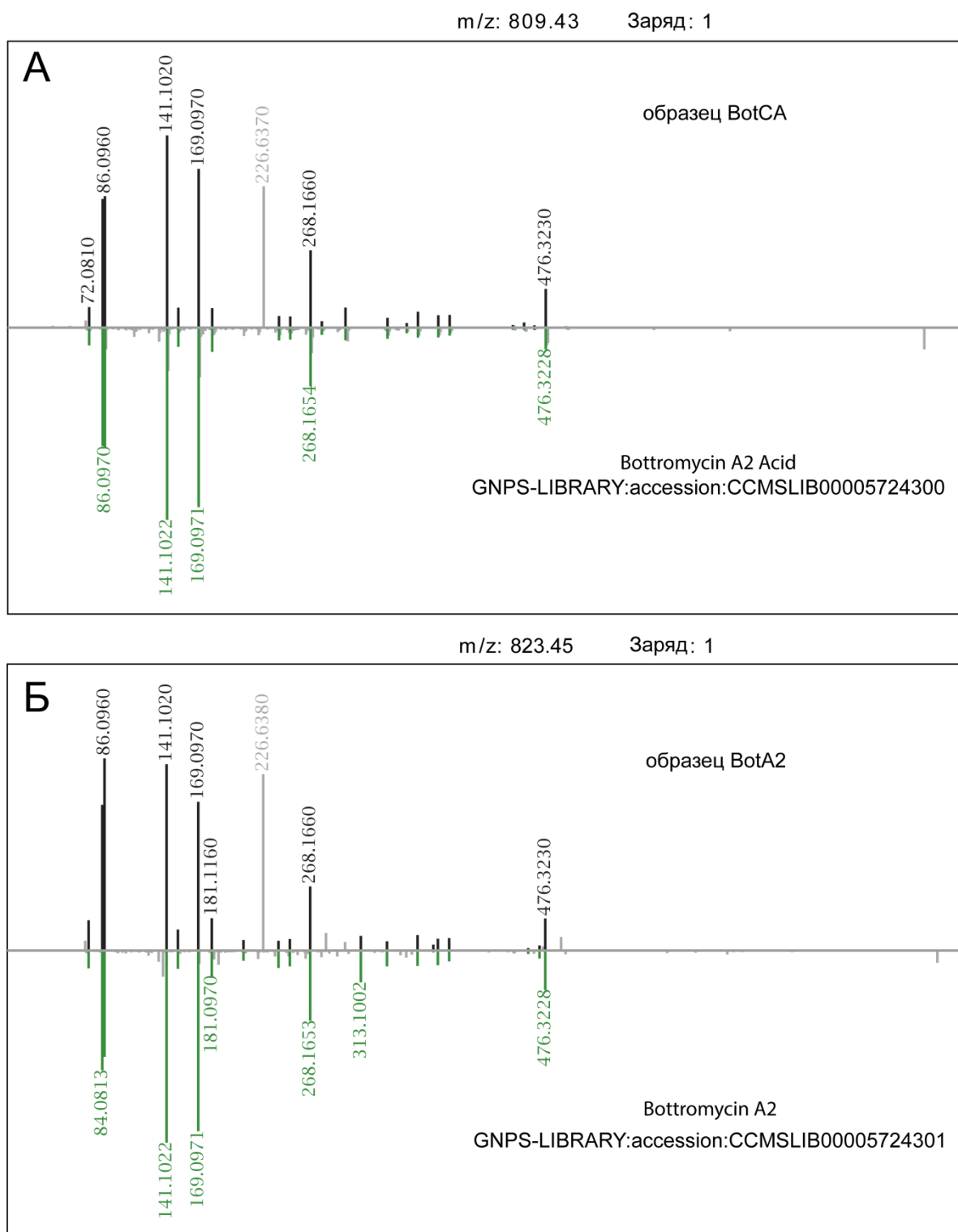
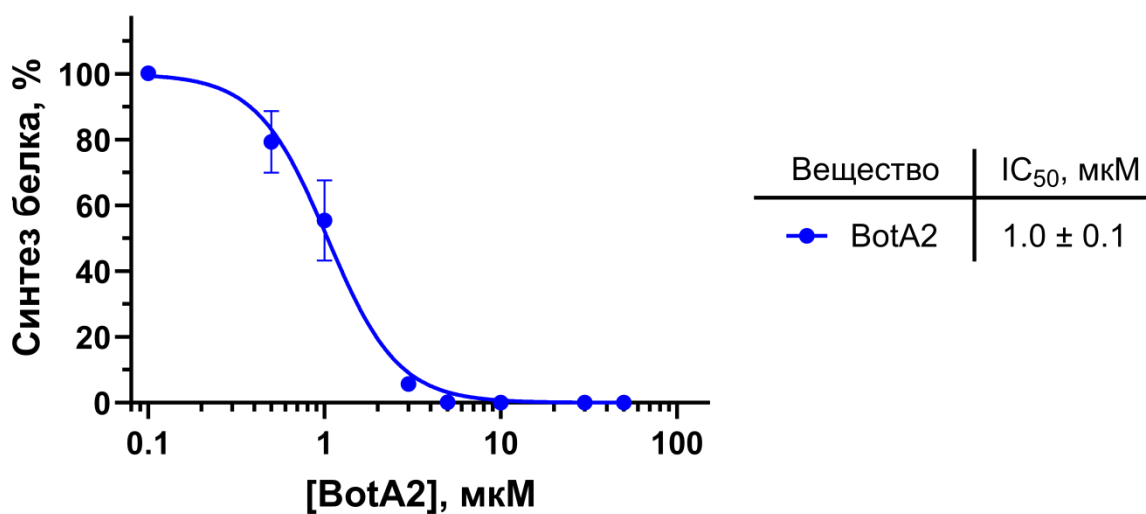


Рисунок П2. Анализ спектров фрагментации BotA2 и BotCA



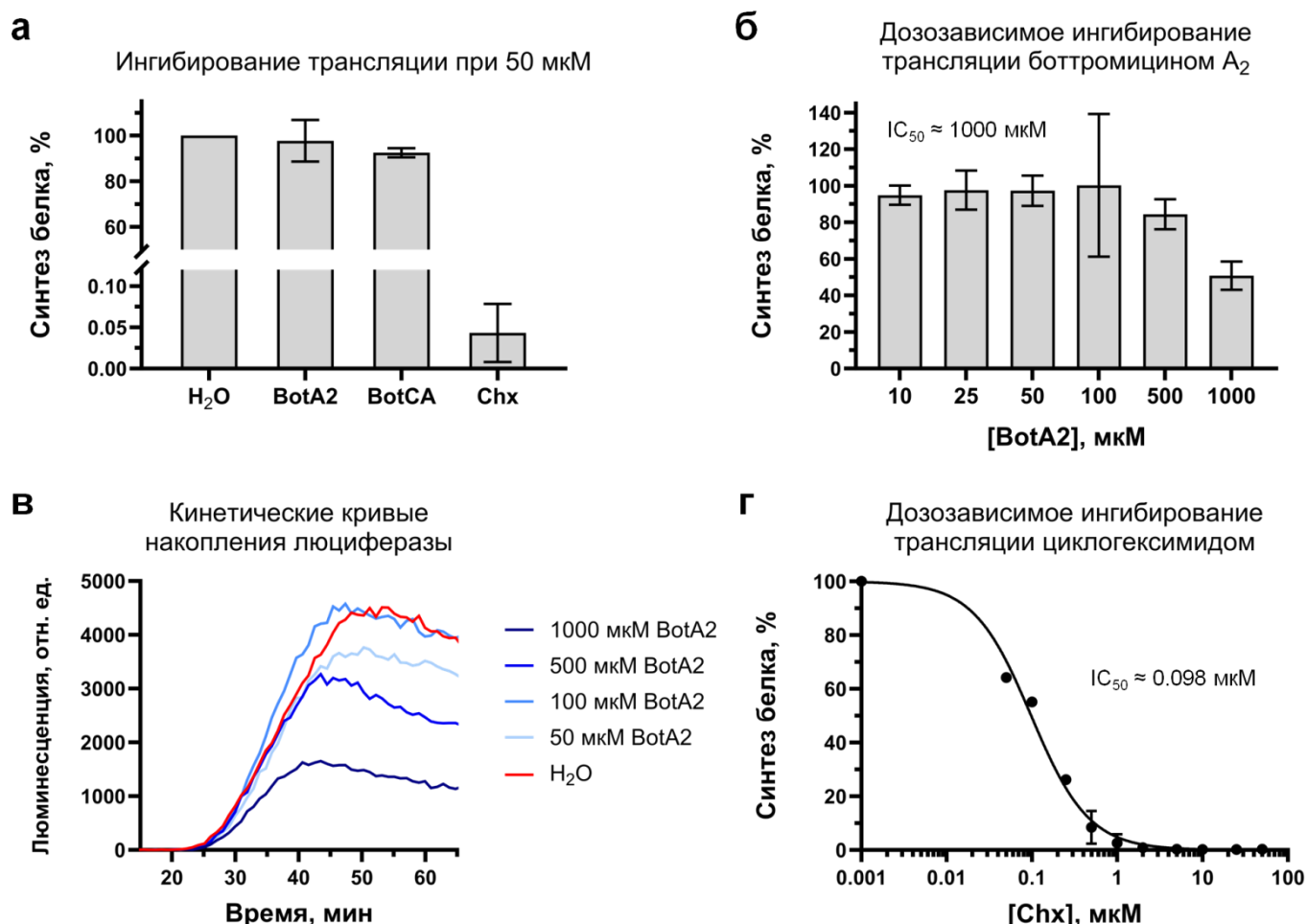
Сравнение спектров фрагментации для BotCA (А) и BotA2 (Б), проиллюстрированных с использованием платформы GNPS [15]. Анализ был проведён для аддуктов $[M+H]^+$. Массы ионов-предшественников указаны на рисунке. Экспериментально полученные паттерны фрагментации сопоставлены со спектрами, найденными в библиотеке GNPS: кислота боттромицина А₂ (запись № CCMSLIB00005724300) и боттромицин А₂ (запись № CCMSLIB00005724301).

Рисунок ПЗ. Ингибирование трансляции *in vitro* под действием BotA2 в бактериальной бесклеточной системе



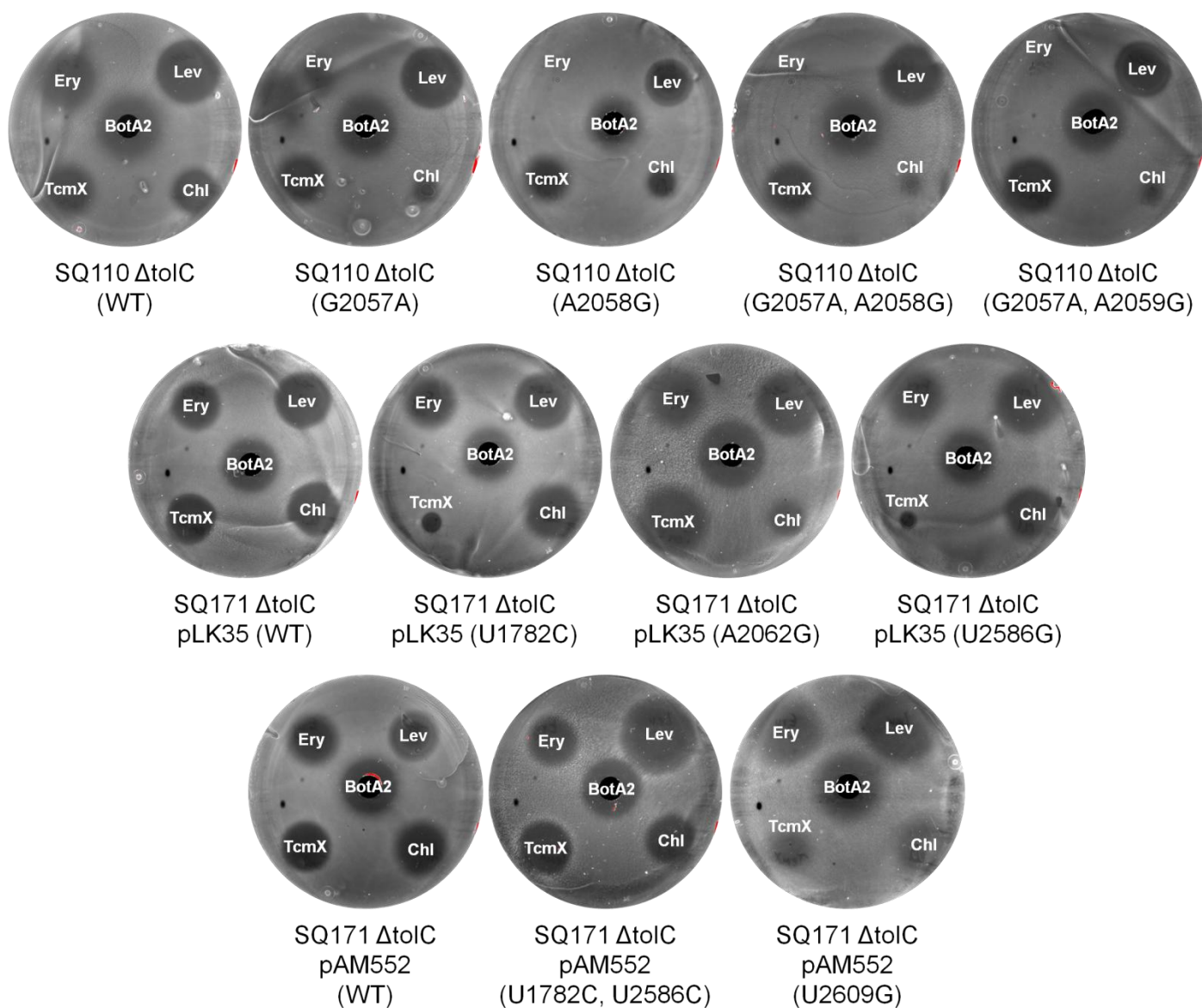
Зависимость эффективности синтеза белка от концентрации боттромицина A₂ (BotA2) оценивали *in vitro* в бактериальной бесклеточной системе трансляции с использованием коммерчески доступного экстракта S30 из клеток *E. coli*. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению, $n \geq 2$. Рассчитанные значения IC₅₀ и 95% доверительные интервалы приведены в таблице.

Рисунок П4. Ингибирование трансляции *in vitro* под действием BotA2 и BotCA в эукариотической бесклеточной системе, полученной из клеток линии НЕК293Т



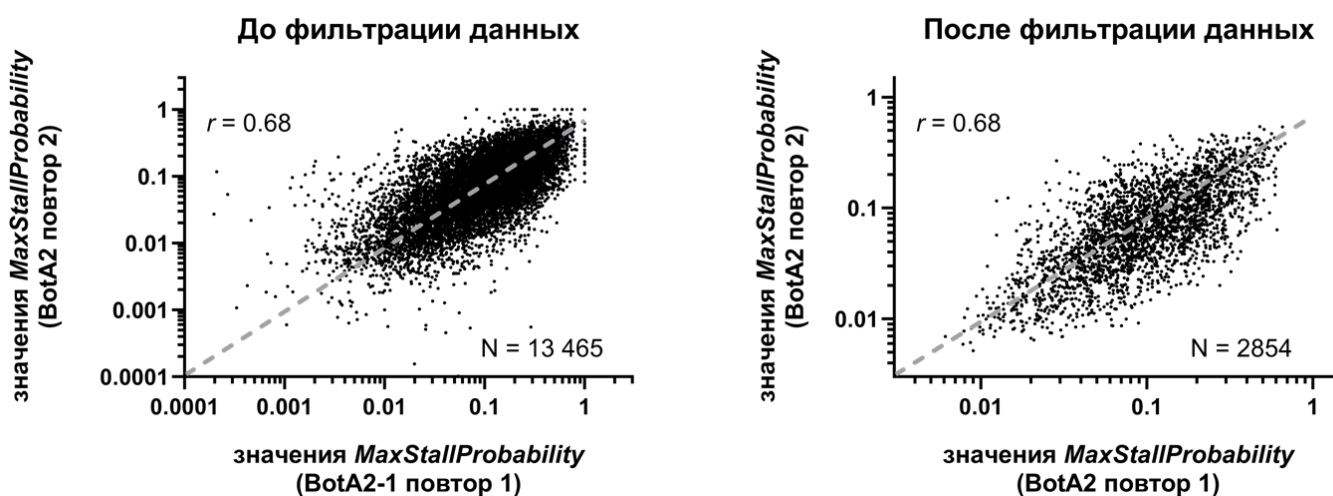
Ингибирование биосинтеза белка оценивали *in vitro* с использованием эукариотической бесклеточной системы на основе экстрактов, полученных из клеток линии НЕК293Т. а – Оценка способности боттромицина A₂ (BotA2) и карбоновой кислоты боттромицина A₂ (BotCA) ингибировать эукариотическую трансляцию при концентрации 50 мкМ. Циклогексимид (Chx) был добавлен в качестве антибиотика сравнения. б – Зависимость эффективности синтеза белка от концентрации BotA2. в – Кинетические кривые накопления активности люциферазы светлячка (Fluc) в присутствии различных концентраций BotA2. Наблюдаемые значения люминесценции находятся в оптимальном диапазоне детекции прибора и не приближаются к верхнему пределу (10⁷ отн. ед.). г – Зависимость эффективности синтеза белка от концентрации циклогексимида. а, б, г – Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению, n ≥ 2.

Рисунок П5. Антибактериальная активность BotA2 на клетках *Escherichia coli*, несущих мутации в гене 23S рРНК



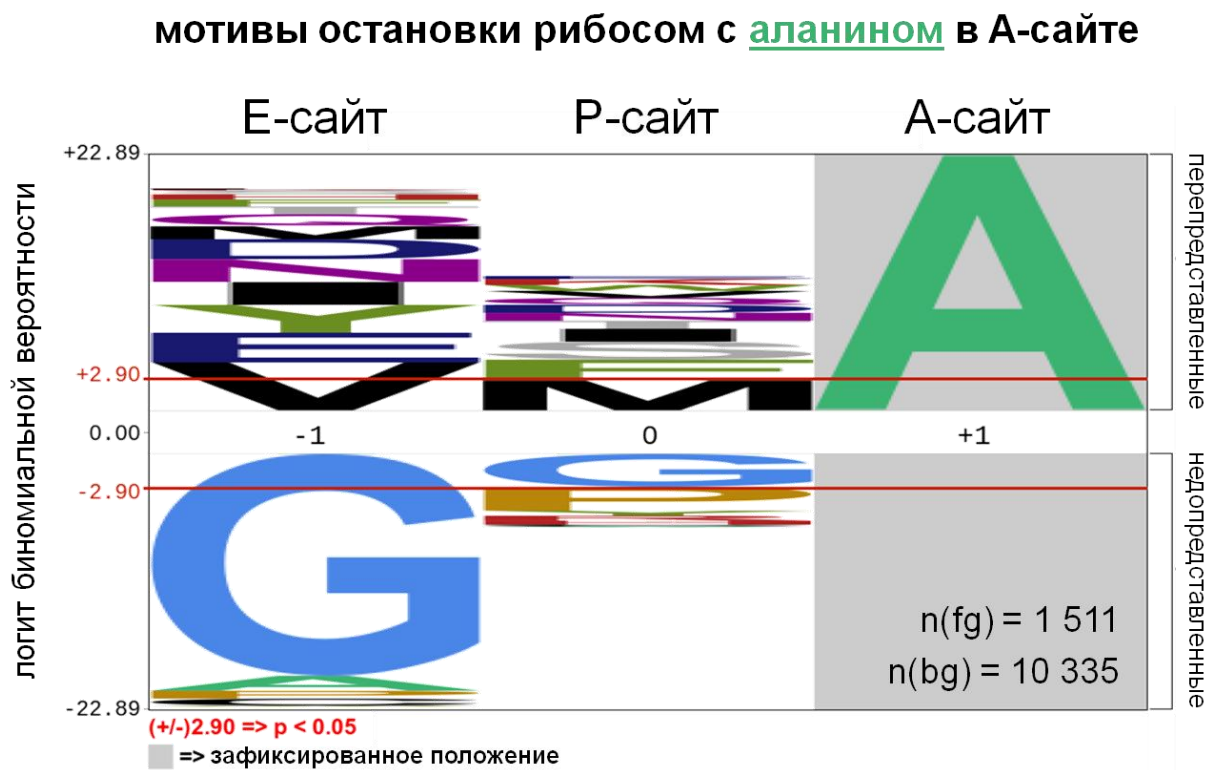
Антибактериальную активность боттромицина A_2 (BotA2) оценивали с помощью метода диффузии в агар. Для анализа были взяты штаммы *E. coli*, устойчивые к классическим антибиотикам, связывающимся с 50S субчастицей рибосомы, таким как эритромицин, тетраценомицин X и хлорамфеникол. Устойчивый фенотип обусловлен точечными мутациями в гене 23S рРНК. В скобках на рисунке указаны соответствующие нуклеотидные замены или WT, что означает отсутствие мутаций. На поверхность чашек со средой LB-агар, покрытой слоем клеток SQ110 Δ tolC или SQ171 Δ tolC, наносили препараты антибиотиков: эритромицин (Ery, 5 мкг), левофлоксацин (Lev, 25 нг), тетраценомицин X (TcmX, 5 мкг), хлорамфеникол (Chl, 2 мкг). В центре каждой чашки делали лунку и заполняли её 50 мкл 1 мМ BotA2, растворённого в 30%-ном водном растворе ацетонитрила.

Рисунок П6. Анализ корреляции показателя *MaxStallProbability* между двумя независимыми экспериментами Toe-seq



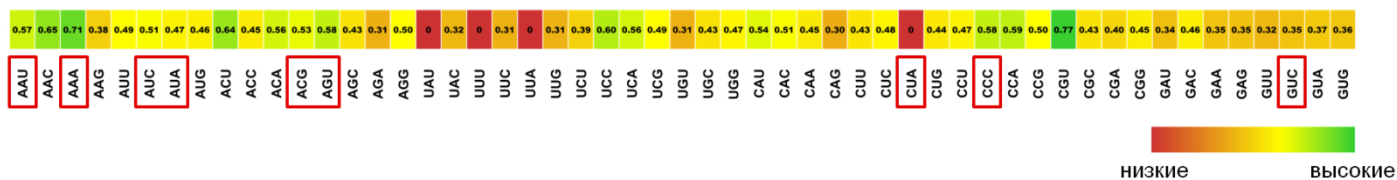
Toe-seq анализ для образцов, обработанных BotA2, был проведён в двух биологических повторах. С целью выявления сайтов остановки рибосом под действием BotA2 для каждой мРНК из библиотеки были рассчитаны значения *MaxStallProbability*, отражающие вероятность того, что антибиотик спровоцирует остановку рибосом на данной мРНК. Для корреляционного анализа было отобрано подмножество мРНК, у которых совпадают предсказанные сайты остановки рибосом (значения *StallPosition*) в обоих повторах. При этом рассматривались только мРНК со значениями *MaxStallProbability* > 0. Количество таких мРНК (N), отобранных для анализа, приведено на каждом графике наряду с коэффициентом ранговой корреляции Спирмена (r), рассчитанным между соответствующими показателями *MaxStallProbability*, $p < 0,0001$ (при двухсторонней альтернативе). Линия тренда показана в виде серой пунктирной линии.

Рисунок П7. pLogo-анализ обнаруженных сайтов останковки рибосом, в которых аланиновые кодоны расположены в А-сайте рибосомы



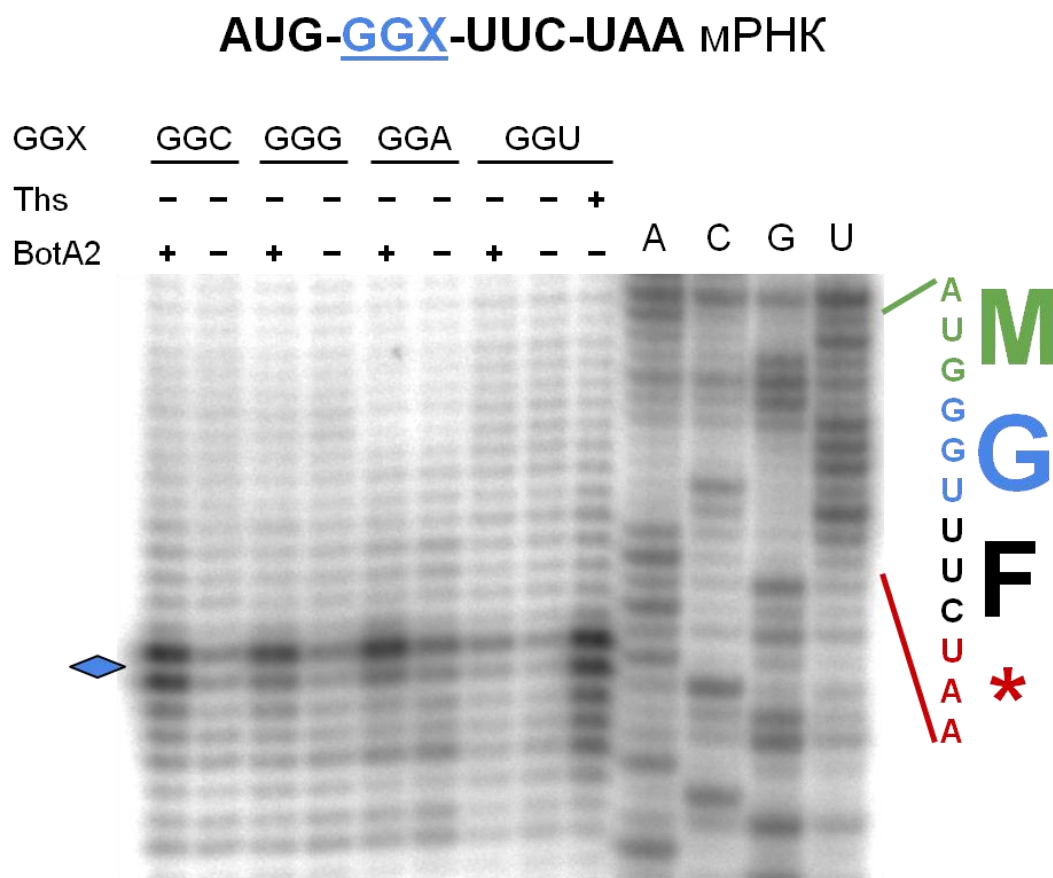
pLogo-анализ подмножества сайтов останковки рибосом, вызванных BotA2, в которых аланиновые кодоны (Ala, A) расположены в А-сайте рибосомы (положение +1). На диаграмме однобуквенным кодом представлены аминокислоты, соответствующие кодомам, встречающимся в Е-, Р- и А-сайтах останковленных рибосом. Высота буквы отображает её статистическую значимость, которая коррелирует с её относительной частотой встречаемости среди подмножества сайтов останковки рибосом. Значение n(fg) соответствует количеству сайтов останковки рибосом, использованных для построения изображения. Значение n(bg) соответствует количеству теоретически возможных сайтов останковки рибосом, которые были использованы для поправки на частоты сочетаний кодонов. Красные горизонтальные линии на диаграмме соответствуют $p = 0,05$.

Рисунок П8. Значения показателя *MaxStallProbability* для остановок рибосом на сайтах AUG-XXX-GGC в зависимости от идентичности кодона XXX



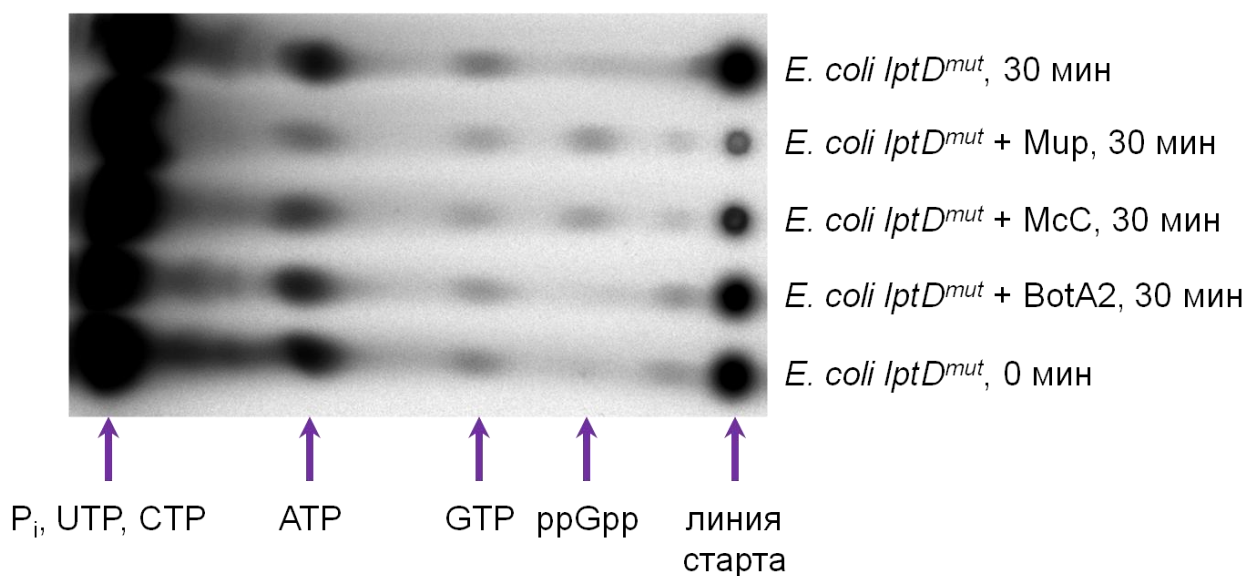
В ячейках тепловой карты приведены значения показателя *MaxStallProbability* в зависимости от идентичности кодона XXX, встречаемого при остановке рибосом на последовательностях типа AUG-XXX-GGC. В данном случае рассматривались только сайты, в которых XXX является вторым кодоном открытой рамки считывания и не кодирует глицин или аланин. Приведённые значения *MaxStallProbability* были рассчитаны как максимальные среди обоих наборов данных Toe-seq, полученных из образцов, обработанных BotA2. Значение *MaxStallProbability*, равное 0, означает, что соответствующий сайт не был обнаружен в обоих наборах данных. Красными рамками выделены кодоны, выбранные для проверки эффективности действия BotA2 методом тоупринтинга.

Рисунок П9. Анализ трансляции серии мРНК, кодирующей пептид fMet-Gly-Phe, в присутствии BotA2 методом тоупринтинга



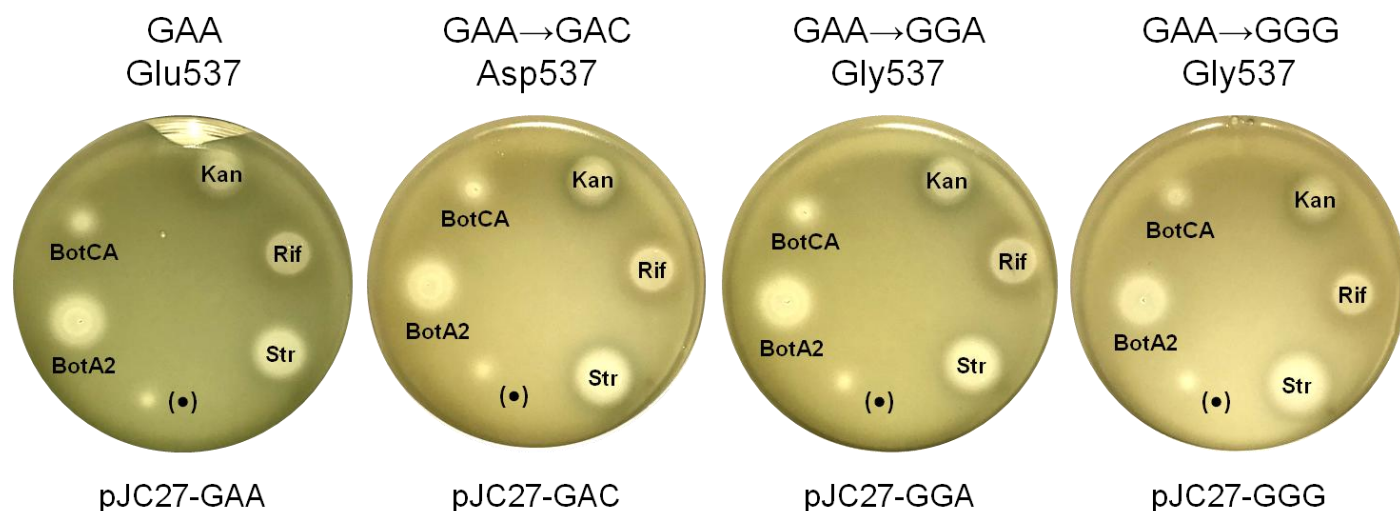
Представленная серия коротких мРНК кодирует все четыре глициновых кодона (GGX) и была использована для оценки эффективности остановки рибосом боттромицином A₂ в зависимости от идентичности глицинового кодона. Последовательности соответствующей открытой рамки считывания и закодированного пептида представлены справа от авторадиограммы. Звездочкой (*) обозначен стоп-кодон. Синим ромбом отмечены полосы, соответствующие остановленным рибосомам. Тиострептон (Ths) был добавлен для отображения сайта начала трансляции. Конечная концентрация антибиотиков в реакциях 50 мкМ.

Рисунок П10. Анализ накопления ppGpp в клетках *E. coli* при обработке боттромицином A₂



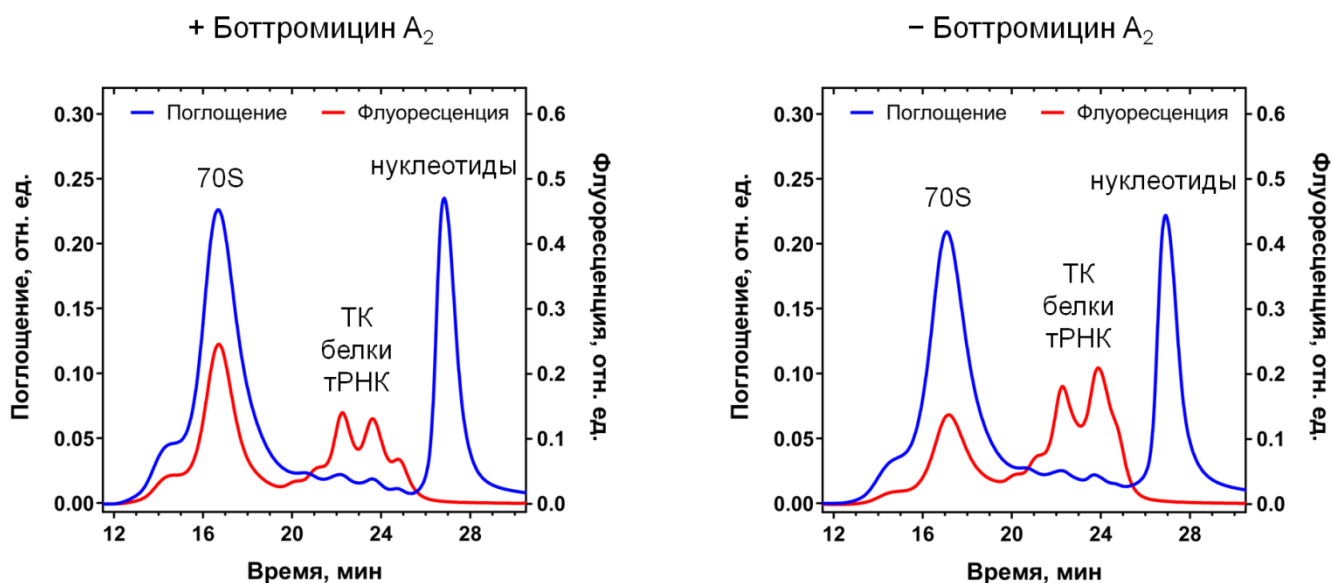
Тонкослойная хроматография [³²P]-меченых нуклеотидов, выделенных из клеток штамма *E. coli lptD^{mut}* после 30-минутной инкубации с боттромицином A₂ (BotA2), микроцином С (McC) или мупироцином (Mup). BotA2 и McC добавляли до конечной концентрации 20 мкМ, в то время как Mup добавляли до конечной концентрации 60 мкМ.

Рисунок П11. Анализ способности BotA2 вызывать ошибки при трансляции



Боттромаицин A_2 (BotA2) не вызывает ошибочного распознавания глициновых кодонов Glu-тРНК^{Glu}. Для анализа были взяты клетки штамма *E. coli* $\Delta tolC$, трансформированные репортёрными конструкциями, несущими мутантные варианты гена β -галактозидазы (*lacZ*) по 537-му кодону. Конструкция pJC27-GAA содержит нативный ген β -галактозидазы, в которой Glu537 является каталитическим остатком, необходимым для ферментативного расщепления субстрата X-Gal. Конструкции pJC27-GAC, pJC27-GGA и pJC27-GGG содержат мутантные варианты *lacZ* с заменами 537-го кодона GAA на GAC, GGA и GGG соответственно. Антибиотики, снижающие точность трансляции (например, канамицин или стрептомицин), повышают вероятность встраивания глутаминовой кислоты в полипептидную цепь, что приводит к образованию функциональной β -галактозидазы. Появление синего окрашивания по краю зоны ингибирования роста бактерий указывает на то, что тестируемый антибиотик вызывает ошибки трансляции. На поверхность чашек со средой LB-агар, покрытой слоем репортёрных клеток, наносили следующие препараты антибиотиков: канамицин (Kan, 5 мкг), рифампицин (Rif, 10 мкг), стрептомицин (Str, 5 мкг), карбоновая кислота боттромаицина A_2 (BotCA, 16,2 мкг) и боттромаицин A_2 (BotA2, 16,5 мкг; (●), 0,4 мкг). Можно заметить, что зона ингибирования роста бактерий при обработке BotCA существенно меньше, чем зона при обработке BotA2, что, вероятно, связано со сниженной способностью BotCA проникать внутрь клеток бактерий.

Рисунок П12. Сравнение профилей эксклюзионной хроматографии рибосомных комплексов, собранных в присутствии или отсутствии BotA2



Профили эксклюзионной хроматографии 70S инициаторных комплексов, запрограммированных мРНК MG (AUG-GGC), после инкубации с тройным комплексом Gly-тРНК^{Gly}(Prf16/17/20)·EF-Tu·GTP в присутствии (слева) или отсутствии (справа) 100 мкМ BotA2. Поглощение измеряли при 260 нм (синий профиль). Флуоресценцию возбуждали при 460 нм и детектировали при 510 нм (красный профиль). ТК – тройные комплексы.

Рисунок П13. Образование кодон-антикодоновых дуплексов при распознавании глициновых кодонов

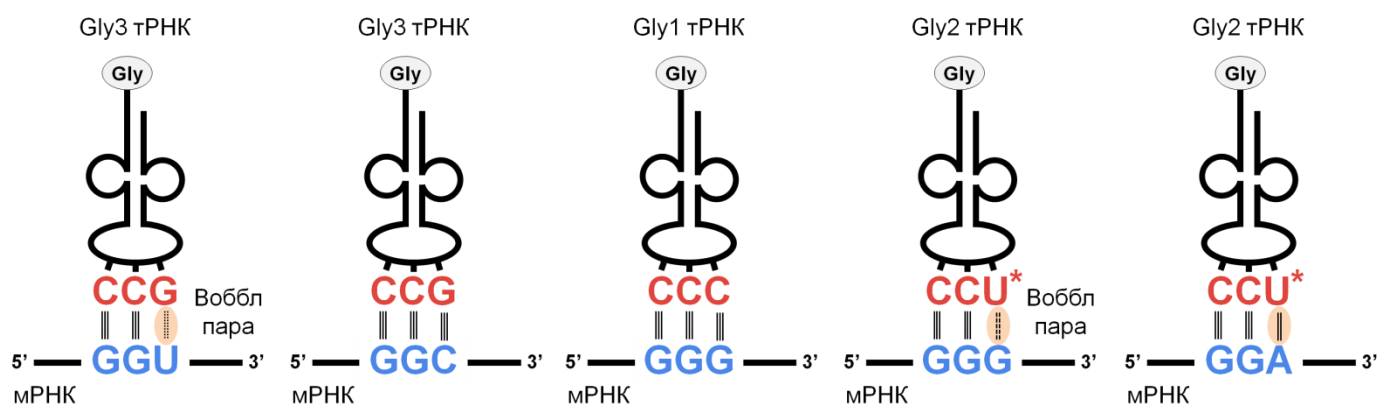


Схема образования кодон-антикодоновых дуплексов между глициновыми кодонами и распознающими их Gly-тРНК^{Gly}. Канонические Уотсон-Криковские пары показаны вертикальными линиями. Точечными линиями обозначено воббл-спаривание оснований. Пунктирными линиями показана воббл-пара оснований, дополнительно стабилизированная модифицированным урацилом (U*). Количество линий соответствует числу образуемых водородных связей. Звездочкой (U*) отмечен 5-метиламинометил-уридин (mnm⁵U). Бледно-оранжевой областью выделены слабые пары оснований в 3-м положении.

M-AGT-GGG-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGAGTGGGTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-AGT-GGA-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGAGTGGATTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-AGT-GGT-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGAGTGGTTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-GGC-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGGGCTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-GGG-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGGGGTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-GGA-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGGGATTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-GGT-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGGGTTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-AGT	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGAGTTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
M-GGC	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAAC ATATGGGCTAAGAGACGGACGAGAGCGGC
CER-R	<u>GCGTTAAGGCTATGTACGGAACAGCTCCTCGCCCTTG</u>
NEW-CER-R	<u>GCGTTAAGGCTATGTACGCGCCGTCCAGCTCGACCAGG</u>
NV2	<u>GCGTTAAGGCTATGTAC</u>
T7-fwd-1	ATGCATAATACGACTCACTATAGGG
T7-fwd-2	CGAATTTAATACGACTCACTATAGG
LP-rev	GCTTGCATGCCTGCAGACGCA

Последовательность T7 промотора выделена жирным шрифтом. Последовательность праймера NV1, используемого для обратной транскрипции, подчеркнута одной линией. Последовательность праймера NV2, также используемого для обратной транскрипции, подчеркнута двумя линиями.

M-CTA-GGC (fMet-Leu-Gly)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGCTAGGCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-CCC-GGC (fMet-Pro-Gly)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGCCCGGCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-AAA-GGC (fMet-Lys-Gly)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGAAAGGCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-AGT-GGC-F (fMet-Ser-Gly-Phe)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGAGTGGCTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTG AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-AGT-GGG-F (fMet-Ser-Gly-Phe)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGAGTGGGTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTG AGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-AGT-GGA-F (fMet-Ser-Gly-Phe)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGAGTGGATTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-AGT-GGT-F (fMet-Ser-Gly-Phe)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGAGTGGTTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGA GCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-GGC-F (fMet-Gly-Phe)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGGGCTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-GGG-F (fMet-Gly-Phe)	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA ACATATGGGGTTCTAAGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCCGTACATAGCCTTAACGC
M-GGA-F	ATGCATAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAA

(fMet-Gly-Phe)	ACAT <u>ATGGGATTCTA</u> AGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCC GTACATAGCCTTAACGC
M-GGT-F (fMet-Gly-Phe)	ATGCATA ATACGACTCACTATAGGG CTTAAGTATAAAGGAGGAAA ACAT <u>ATGGGTTTCTA</u> AGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTTCC GTACATAGCCTTAACGC
M-AGT (fMet-Ser)	ATGCATA ATACGACTCACTATAGGG CTTAAGTATAAAGGAGGAAA ACAT <u>ATGAGTTA</u> AGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGTTCC GTACATAGCCTTAACGC
MG (fMet-Gly)	ATGCATA ATACGACTCACTATAGGG CTTAAGTATAAAGGAGGAAA ACAT <u>ATGGGCTA</u> AGAGACGGACGAGAGCGGCCTGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGTTCCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTGCAGC TGGACGGCGC GTACATAGCCTTAACGC
MF (fMet-Phe-...)	CGAATTT ATACGACTCACTATAGGG AATTCAAAAATTTAAAAGT TAACAGGTATACATACT <u>ATGTTTACGATTACTACGATCTTCTTCAC</u> <u>TTAATGCGTCTGCAGGCATGCAAGC</u>
MV (fMet-Val-...)	CGAATTT ATACGACTCACTATAGGG AATTCAAAAATTTAAAAGT TAACAGGTATACATACT <u>ATGGTTTTTATTACTACGATCTTCTTCAC</u> <u>TTAATGCGTCTGCAGGCATGCAAGC</u>

Последовательность T7 промотора и последовательности, комплементарные праймерам NV1 и NV2, выделены жирным шрифтом. Кодированные последовательности подчёркнуты.

Таблица П3. Параметры наборов данных Toe-seq

Необработанные наборы данных, <u>перед</u> нормировкой на контроли	
Количество уникальных мРНК во всех 4 наборах данных	57 972
Количество мРНК в наборе данных BotA2-1 (BotA2 повтор 1)	56 687
Количество мРНК в наборе данных BotA2-2 (BotA2 повтор 2)	56 431
Количество мРНК в наборе данных Контроль-1 (Контроль повтор 1)	55 835
Количество мРНК в наборе данных Контроль-2 (Контроль повтор 2)	56 089
Число картированных ридов в наборе данных BotA2-1 (BotA2 повтор 1)	9 903 509
Число картированных ридов в наборе данных BotA2-2 (BotA2 повтор 2)	9 360 524
Число картированных ридов в наборе данных Контроль -1 (Контроль повтор 1)	6 148 055
Число картированных ридов в наборе данных Контроль -2 (Контроль повтор 2)	5 923 640
Наборы данных <u>после</u> нормировки на контроли, <u>до</u> фильтрации	
Количество уникальных мРНК в 2 наборах данных (BotA2 повторы 1 и 2)	56 243
Количество мРНК в наборе данных BotA2-1 (BotA2 повтор 1)	55 292
Количество мРНК в наборе данных BotA2-2 (BotA2 повтор 2)	55 387
Количество общих мРНК между двумя наборами данных (BotA2 повторы 1 и 2)	54 436
Количество мРНК с совпадающими сайтами остановки рибосом в двух наборах данных (BotA2 повторы 1 и 2)	13 290

Наборы данных после нормировки на контроли и после фильтрации

Количество уникальных мРНК в 2 наборах данных (BotA2 повторы 1 и 2)	24 156
Количество мРНК в наборе данных BotA2-1 (BotA2 повтор 1)	15 995
Количество мРНК в наборе данных BotA2-2 (BotA2 повтор 2)	15 694
Количество общих мРНК между двумя наборами данных (BotA2 повторы 1 и 2)	7533
Количество мРНК с совпадающими сайтами остановки рибосом в двух наборах данных (BotA2 повторы 1 и 2)	2854

Таблица П4. Антибактериальная активность BotA2 в отношении штаммов, устойчивых к хлорамфениколу

Штамм	Вещество, минимальная ингибирующая концентрация (МИК), мкМ		
	BotA2	BotCA	Chl
<i>E. coli lptD^{mut}</i> ^a	6,25	25	200
<i>B. subtilis</i> 168 ^b	0,78–1,56	нп	12,5
<i>B. subtilis</i> 168 рНТ01-cat ^c	0,78–1,56	нп	200
<i>B. subtilis</i> 168 рНТ01-cfr ^d	1,56–3,13	нп	100

^a *E. coli lptD^{mut}*: устойчивый к хлорамфениколу штамм с конститутивной экспрессией гена *cat*, который кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу.

^b *B. subtilis* 168: штамм, чувствительный к хлорамфениколу.

^c *B. subtilis* 168 рНТ01-cat: устойчивый к хлорамфениколу штамм с конститутивной экспрессией гена *cat*, который кодирует хлорамфениколацетилтрансферазу.

^d *B. subtilis* 168 рНТ01-cfr: устойчивый к хлорамфениколу штамм с конститутивной экспрессией гена *cfr*, который кодирует метилтрансферазу Cfr, модифицирующую остаток A2503 в 23S рРНК.

Измерения МИК были проведены как минимум в двух повторностях.

нп, не проверялось.

Таблица П5. Характеристики глициновых кодонов и тРНК^{Gly} в клетках *Escherichia coli*

Характеристики глициновых кодонов в клетках <i>E. coli</i>						
Кодон	тРНК ^{Gly}	Встречаемость кодона в геноме, % [16]	Встречаемость кодона в транскриптоме, % [17]	RSCU, [18]	CEI, [19]	CP, [19]
GGU	Gly3	2,37	3,62	2,28	14,96	698 ± 65
GGC	Gly3	2,06	2,97	1,65	4,35	514 ± 50
GGG	Gly1 Gly2	1,23	0,92	0,04	-13,39	226 ± 19
GGA	Gly2	1,36	0,63	0,02	-15,15	229 ± 19

Характеристики тРНК^{Gly} в клетках *E. coli*

тРНК ^{Gly}	Антикодон	Модификации в антикодоне [20]	Число генов тРНК в геноме [21]	Концентрация тРНК в клетке, мкМ [17]	Концентрация свободного тройного комплекса в клетке, мкМ [17]
Gly1	CCC	–	1	4,43	3,44–3,51
Gly2	UCC	mnm ⁵ U	1	6,65	4,51–4,70
Gly3	GCC	–	4	24,96	14,33–15,38

RSCU (от англ. relative synonymous codon usage) – относительная встречаемость синонимичных кодонов. Значения RSCU рассчитаны для генов с высокой экспрессией. Они представляют собой наблюдаемую частоту встречаемости кодонов, нормированную на ожидаемую частоту, рассчитанную на основе предположения о равном использовании всех синонимичных кодонов, кодирующих глицин [18].

CEI (от англ. codon expression index) – индекс экспрессии кодона. Показатель CEI соответствует уровню статистической значимости корреляции между частотой встречаемости определённого кодона в генах *E. coli* и уровнем экспрессии соответствующего белка [19]. Другими словами, CEI отражает, имеет ли определённый кодон склонность к тому, чтобы быть перепредставленным в генах с высокой экспрессией.

CP (от англ. codon productivity) – продуктивность кодона. Показатель CP отражает, сколько аминокислот, используемых клетками *E. coli* для синтеза белков, в среднем приходится на каждый конкретный кодон [19]. CP зависит от идентичности кодона и частот соответствующих тРНК.

mnm⁵U, 5-метиламинометил-уридин.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Osterman, I. A., Wieland, M., Maviza, T. P., Lashkevich, K. A., Lukianov, D. A., Komarova, E. S., Zakalyukina, Y. V., Buschauer, R., Shiriaev, D. I., Leyn, S. A., Zlamal, J. E., Biryukov, M. V., Skvortsov, D. A., Tashlitsky, V. N., Polshakov, V. I., Cheng, J., Polikanov, Y. S., Bogdanov, A. A., Osterman, A. L., Dmitriev, S. E., et al. (2020) Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel, *Nature chemical biology*, **16**, 1071–1077, doi: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0578-x>.
2. Yagmurov, E., Tsibulskaya, D., Livenskiy, A., Serebryakova, M., Wolf, Y. I., Borukhov, S., Severinov, K., and Dubiley, S. (2020) Histidine-Triad Hydrolases Provide Resistance to Peptide-Nucleotide Antibiotics, *mBio*, **11**, e00497-00420, doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.00497-20>.
3. Orelle, C., Carlson, S., Kaushal, B., Almutairi, M. M., Liu, H., Ochabowicz, A., Quan, S., Pham, V. C., Squires, C. L., Murphy, B. T., and Mankin, A. S. (2013) Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**, 5994–6004, doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01673-13>.
4. Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 6640–6645, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
5. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Molecular systems biology*, **2**, 2006.0008, doi: <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
6. Manickam, N., Joshi, K., Bhatt, M. J., and Farabaugh, P. J. (2016) Effects of tRNA modification on translational accuracy depend on intrinsic codon-anticodon strength, *Nucleic acids research*, **44**, 1871–1881, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1506>.
7. Polikanov, Y. S., Szal, T., Jiang, F., Gupta, P., Matsuda, R., Shiozuka, M., Steitz, T. A., Vazquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2014) Negamycin interferes with decoding and translocation by simultaneous interaction with rRNA and tRNA, *Molecular cell*, **56**, 541–550, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.021>.
8. Orelle, C., Carlson, E. D., Szal, T., Florin, T., Jewett, M. C., and Mankin, A. S. (2015) Protein synthesis by ribosomes with tethered subunits, *Nature*, **524**, 119–124, doi: <https://doi.org/10.1038/nature14862>.
9. Pavlova, J. A., Khairullina, Z. Z., Tereshchenkov, A. G., Nazarov, P. A., Lukianov, D. A., Volynkina, I. A., Skvortsov, D. A., Makarov, G. I., Abad, E., Murayama, S. Y., Kajiwara, S., Paleskava, A., Konevega, A. L., Antonenko, Y. N., Lyakhovich, A., Osterman, I. A., Bogdanov, A. A., and Sumbatyan, N. V. (2021) Triphenylphosphonium Analogs of Chloramphenicol as Dual-Acting Antimicrobial and Antiproliferating Agents, *Antibiotics*, **10**, 489, doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050489>.

10. Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R. E. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature protocols*, **3**, 163–175, doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
11. Terenin, I. M., Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2013) A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m⁷G-cap-, nor IRES-dependent, *Nucleic acids research*, **41**, 1807–1816, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1282>.
12. Kabilov, M. R., Komarova, E. S., Pichkur, E. B., Zotova, P. A., Kasatsky, P. S., Volynkina, I. A., Tupikin, A. E., Pavlova, J. A., Lukianov, D. A., Osterman, I. A., Pyshniy, D. V., Paleskava, A., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A., Konevega, A. L., and Sergiev, P. V. (2024) Context Specificity of Translation Inhibitors Revealed by Toe-seq, *Research Square*, doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3832009/v1>.
13. O'Shea, J. P., Chou, M. F., Quader, S. A., Ryan, J. K., Church, G. M., and Schwartz, D. (2013) pLogo: a probabilistic approach to visualizing sequence motifs, *Nature methods*, **10**, 1211–1212, doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2646>.
14. Shapovalova, K. S., Zatonsky, G. V., Razumova, E. A., Ipatova, D. A., Lukianov, D. A., Sergiev, P. V., Grammatikova, N. E., Tikhomirov, A. S., and Shchekotikhin, A. E. (2024) Synthesis and Antibacterial Activity of New 6"-Modified Tobramycin Derivatives, *Antibiotics*, **13**, 1191, doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121191>.
15. Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crusemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderon, M., Kersten, R. D., et al. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking, *Nature biotechnology*, **34**, 828–837, doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
16. Nakamura, Y., Gojobori, T., and Ikemura, T. (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000, *Nucleic acids research*, **28**, 292, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.292>.
17. Rudolf, S., and Lipowsky, R. (2015) Protein Synthesis in *E. coli*: Dependence of Codon-Specific Elongation on tRNA Concentration and Codon Usage, *PloS one*, **10**, e0134994, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134994>.
18. Sharp, P. M., and Li, W. H. (1987) The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications, *Nucleic acids research*, **15**, 1281–1295, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1281>.
19. Zaytsev, K., Bogatyreva, N., and Fedorov, A. (2024) Link Between Individual Codon Frequencies and Protein Expression: Going Beyond Codon Adaptation Index, *International journal of molecular sciences*, **25**, 11622, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms252111622>.
20. Cappannini, A., Ray, A., Purta, E., Mukherjee, S., Boccaletto, P., Moafinejad, S. N., Lechner, A., Barchet, C., Klaholz, B. P., Stefaniak, F., and Bujnicki, J. M. (2024) MODOMICS: a database of

RNA modifications and related information. 2023 update, *Nucleic acids research*, **52**, D239–244, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1083>.

21. Rocha, E. P. (2004) Codon usage bias from tRNA's point of view: redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization, *Genome research*, **14**, 2279–2286, doi: <https://doi.org/10.1101/gr.2896904>.