

ВАТЛИН Алексей Александрович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ И
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММА *STREPTOMYCES FRADIAE* ATCC 19609 К
ОЛИГОМИЦИНУ А И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМ**

Специальность 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ФГБУН ИОГен РАН), г. Москва.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук

КАРАТАЕВ Геннадий Иванович, заведующий лабораторией генетики бактерий, Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, г. Москва (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН)

Кандидат биологических наук

ВОЕЙКОВА Татьяна Александровна, заведующая лабораторией генетики микроорганизмов Государственного научного центра Российской Федерации Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов г. Москва (ФГУП «ГосНИИ генетики»).

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное государственное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им М. В. Ломоносова).

Защита состоится «25» мая 2017 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.
aspirantura@vigg.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Олигомицин А – перспективный макролидный антибиотик для противоопухолевой или антимикробной терапии, однако использование в клинической практике ограничено его токсичностью. Основной механизм действия олигомицина А и его аналогов у эукариотических и бактериальных клеток связывают с ингибированием клеточной активности FoF1-АТФ-синтазы путем взаимодействия с С-субъединицей, которая является высококонсервативным ферментом как у бактерий, так и у человека. Однако получение мутантов устойчивости сверхчувствительного штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А не увенчалось успехом, что привело к предположению о существовании дополнительных биомишеней олигомицина А в клетке. По имеющимся литературным данным в клетках существует несколько биомишеней олигомицина А помимо FoF1-АТФ-синтазы.

Для снижения токсичности олигомицина А и изучения механизмов чувствительности к нему в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе ведутся работы по получению новых полусинтетических производных олигомицина А, в структурах которых проводится направленное изменение функциональных групп.

Выявление новых потенциальных внутриклеточных мишеней позволит понять природу сверхчувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609, а также исследовать механизмы возникновения устойчивости у бактерий к олигомицину А и его производным.

Разработанность темы исследования. Сегодня известно много механизмов возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам, в том числе: модификация биомишени антибиотика путем метилирования или возникновения мутации в сайте связывания биомишени, выброс антибиотика из клетки или его модифицирование, приводящее к инаktivации.

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 является сверхчувствительным к большинству известных антибиотиков, в том числе к олигомицину А (<0.001 нмоль/мл или 0.0005 нмоль/диск). Сверхчувствительность штамма *S. fradiae* ATCC 19609 может быть обусловлена несколькими механизмами действия олигомицина А, в том числе способностью к проникновению в клетку и отсутствием селективных механизмов выброса антибиотика из клетки *S. fradiae*, в частности обусловленных MDR системами.

Следует отметить, что получить мутанты устойчивые к олигомицину А у *S. lividans* 66 были безуспешны. Новые синтезированные производные планировалось использовать для изучения влияния заместителя при С33 атоме углерода в структуре олигомицина А на активность вещества в тест-системе *S. fradiae* ATCC 19609. Можно предположить, что снижение активности производных может быть обусловлено отсутствием способности действовать на некоторые биомишени олигомицина А и/или снижением проницаемости клетки для этих производных, или осуществлением селективного выброса из клетки. Поэтому именно эти производные олигомицина А были использованы в работе для получения мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А. В дальнейшем планировалось проведение биоинформатического анализа их геномов с целью выявления единичных нуклеотидных замен в возможных генах-кандидатах в биомишени, а также установления механизма возникновения устойчивости.

Цель работы. Получение мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к олигомицину А и его синтетическим производным, и изучение механизмов устойчивости.

Задачи:

1. Определение уровня чувствительности лабораторного штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным.
2. Секвенирование генома штамма *S. fradiae* ATCC 19609 и аннотация генов, потенциально вовлеченных в процесс формирования устойчивости к олигомицину А и его производным.
3. Получение и характеристика мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А (Olg1, Olg4).
4. Полногеномное секвенирование отобранных Olg(1,4)R штаммов и проведение сравнительного геномного анализа устойчивых штаммов и штамма дикого типа для идентификации мутаций, которые привели к возникновению Olg(1,4)R фенотипа.
5. Изучение молекулярных механизмов устойчивости у полученных мутантных штаммов к олигомицину А и его производным с помощью транскрипционного и протеомного анализа.

Научная новизна. Впервые проведено полногеномное секвенирование и аннотация генома штамма *S. fradiae* ATCC 19609.

Впервые выявлен механизм возникновения устойчивости к производным олигомицина А – нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицину. Механизм устойчивости к нитрон-олигомицину обусловлен мутацией в гене *padR* полифункционального транскрипционного регулятора двойного действия, который может быть вовлечен в регуляцию выброса антибиотика из клетки. Охарактеризован новый механизм регуляции спорообразования и формирования мицелия у штамма *S. fradiae* ATCC 19609 транскрипционным регулятором PadR, и его роль в регуляции генов ABC – транспортеров. Установлена возможная биомиссия действия (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицина – хеликазы IV, мутация в гене которой приводит к снижению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А в 10 раз.

Практическая значимость. Штамм дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609 и полученные мутантные штаммы, устойчивые к производным олигомицина А, могут быть использованы как комплексная тест-система для скрининга новых природных антибиотиков и их полусинтетических производных, активных в отношении патогенных штаммов бактерий, таких как *Actinomyces graevenitzii*, *A. gerencseriae*, *A. urogenitalis*, *Nocardia brasiliensis*, *Propionibacterium propionicum*, *N. asteroides*, *Streptomyces albus* и другие.

Выявлен один из механизмов устойчивости (мутация в гене хеликазы привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицину), возможно приводящий к снижению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам.

Некоторые установленные механизмы устойчивости к производным олигомицина А штамма *S. fradiae* ATCC 19609 могут быть использованы при характеристике устойчивости раковых клеток в клинической практике и при создании противораковых препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявлены гены, отвечающие за формирование резистентности у штамма *S. fradiae* ATCC 19609 - гены четырех MDR ABC транспортеров, два гена устойчивости к даунорубину (*drnC*, *brcA*) и ген устойчивости к макролидным антибиотикам *macB2*; пять генов непарных субъединиц пермеаз MDR ABC транспортеров; ген MDR транспортера семейства MatE, ген транспортера семейства MFS, а также ген устойчивости к пуромицину семейства *emrB/qacA* и ген двусубъединичного MDR ABC транспортера, гомологичного гену белка Pgp человека
2. Один из механизмов устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину обусловлен мутацией в гене хеликазы IV, которая вовлечена в процесс репарации ДНК.
3. Один из механизмов устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к нитрон-олигомицину A обусловлен мутацией в гене *padR* – полифункциональном транскрипционном регуляторе.
4. Олигомицин A является слабым ингибитором АТФ-синтазной активности *S. fradiae* ATCC 19609.

Степень достоверности и апробация результатов. Автор опубликовано 6 статей по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: на Междисциплинарном Симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии (МОБИХим 2015, Новый Свет, Крым, сентябрь 2015 г.), и на встрече рабочей группы США-Россия по профилактике и лечению ВИЧ-инфекции и сопутствующих заболеваний (Санкт-Петербург, апрель 2016 г.). Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2013-2016 гг. Апробация диссертационной работы была проведена 27 февраля 2017 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Личный вклад автора в исследование. Автор данной работы выполнил наибольшую часть исследования самостоятельно, а именно: охарактеризовал штамм *S. fradiae* ATCC 19609, модельный объект *S. lividans* 66 и *S. albus* ATCC 21132 по спектру устойчивости к антибиотикам различных классов, в том числе к олигомицину A и его производным; получил мутантные штаммы *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивые к нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину, провел сравнительный биоинформатический анализ геномов для поиска единичных нуклеотидных замен, транскрипционный и протеомный анализ полученных штаммов, а также стандартные молекулярно-генетические манипуляции, такие как выделение ДНК, конструирование праймеров, проведение ПЦР, электрофореза в агарозном геле и электрофореза белков в ПААГ в денатурирующих условиях, подготовка проб на секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей, микробиологическая работа с непатогенными бактериями. Эксперименты по исследованию *in vitro* АТФ-синтазной активности олигомицина A на инвертированных мембранных везикулах, цитотоксичности производных олигомицина A, полногеномное секвенирование геномов исходного и мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC и аннотация генов устойчивости

исходного штамма *S. fradiae* ATCC 19609 проводились совместно с сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН.

Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП Института биохимии им. А.Н.Баха РАН.

Автор лично проводил анализ полученных результатов и оформлял их для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании статей по результатам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, пяти глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы, 1 приложения. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, включает 13 таблиц и 29 рисунков. Список используемой литературы включает 187 публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Первые пять глав диссертации посвящены литературному обзору, описывающему: макролидные антибиотики – классификация, механизмы действия; механизмы устойчивости к макролидным антибиотикам; известные механизмы действия олигомицина А на эукариотические и бактериальные клетки, АТФ-синтаза как биомишень действия олигомицина А у эукариотов; антибиотики группы олигомицинов и механизмы их действия; существующие подходы поиска новых биомишеней.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. В работе использовались штаммы *Streptomyces albus* ATCC 21132, *S. fradiae* ATCC 19609 и *S. lividans* 66.

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 выращивали на твердой агаризованной среде Ср-15 (соевая мука 0,5%, кукурузный экстракт 0,5%, меласса 0,5%, крахмал 0,5%, (NH₄)₂SO₄ 0,05%, NaCl 0,05%, MgSO₄ 0,07%, CaCO₃ 0,1%, агар 2%) в течение 10 дней при температуре 28°C; штаммы *S. albus* ATCC21132 и *S. lividans* 66 выращивали на твердой агаризованной среде ISP (солодовый (мальт) экстракт 1,5%, дрожжевой экстракт 0,5%, крахмал 0,5%, CaCO₃ 0,3%, агар – 2%, pH 7,5) в течение 7-10 дней при температуре 28°C.

Твердые среды содержали 2,0% агара. В качестве среды для тестирования соединений в тест-системе использовали среду MD (K₂HPO₄ 0,05%, MgSO₄ 0,05%, NaCl 0,05%, FeSO₄ 0,001%, KNO₃ 0,1%, крахмал 1%, агар 2%).

Получение мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А. Для получения мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А, штамм дикого типа выращивали на агаризованной среде Ср-15 в течение 10 дней при температуре 28°C. Затем споровую суспензию (КОЕ от 6*10⁹) высевали в полужидком агаре верхним слоем на чашки Петри со средой MD-2%, содержащей производные олигомицина А в различных концентрациях. После этого производили отбор и моноклональный расщеп выросших колоний на среде Ср-15, содержащей производное олигомицина А в различных концентрациях.

Олигонуклеотиды. Синтез олигонуклеотидов проводили в компаниях «Синтол» и «Евроген». Олигонуклеотиды для клонирования подбирали при помощи программы Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.), для секвенирования клонированных фрагментов в плазмиде – при помощи программы Primer BLAST NCBI.

Манипуляции с НК. Для выделения тотальной ДНК использовали стандартные методики для актинобактерий рода *Streptomyces* по Hopwood et al., 1986. Выделенную полногеномную ДНК очищали с помощью набора GenElute Bacterial Genomic DNA Kits SIGMA NA2110-1KT.

Выделение фрагмента ДНК из 1% агарозного геля проводили с помощью наборов GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) или QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Очистку ДНК из реакционной смеси (после амплификации) проводили наборами GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием набора High Fidelity PCR Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) на приборах CFX96 (Bio-Rad), SpeedCycler2 (AnalyticJena) и Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология).

Для анализа длины и количества фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле (агароза “Amresco”, США) в электродном буфере TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6). в качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК фага λ, рестрицированного по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* (ThermoFischer Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler (ThermoFischer Scientific, США). Точное количество ДНК в пробе устанавливали с использованием набора Qubit dsDNA BR Kit (ThermoFischer Scientific, США) на приборе Qubit (ThermoFischer Scientific, США).

Операции по выделению РНК проводили с использованием стандартных методик набора TRIzol® RNA Isolation Reagents. Образцы РНК обрабатывались ДНКазой по стандартному протоколу набора Ambion. (Cat number AM2222).

Полногеномное секвенирование штаммов *S. fradiae* ATCC 19609. Полногеномное секвенирование проводилось с использованием стандартных наборов и программ Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). Полученные прочтения собирались в последовательность с использованием программы GS de novo assembler version 3.0 (Roche). Автоматическая аннотация генома проводилась с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok).

Двумерный электрофорез и масс-спектрометрический анализ. Двумерный гелевый электрофорез (SDS-PAGE) проводили в соответствии с методом O’Farrell, 1975 с незначительными изменениями. Образцы для масс-спектрометрии получены методом, рекомендованным Promega (США); Масс-спектры получены методом, рекомендованным Bruker Daltonics (США) на аналитическом масс-спектрометре Bruker Daltonics (UltrafleXtreme MALDI TOF / TOF MS) (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Белки определены с использованием программного обеспечения Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI.

Синтез кДНК и ПЦР в реальном времени. Синтез кДНК осуществляли с использованием стандартных процедур, установленных Invitrogen Company, набор SuperScript III Reverse Transcriptase, #1808-093. После синтеза кДНК, анализ экспрессии генов проводили количественной ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green, на амплификаторе Bio-Rad CFX96 Touch.

Получение препаратов инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* ATCC 19609. Мицелий *S. fradiae* ATCC 19609 трижды отмывали в растворе, содержащем 0,25 М сахарозу, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Клетки суспендировали в 10 объемах буфера, содержащего 50 мМ MOPS, pH-7,5, 10 мМ MgCl₂, коктейль ингибиторов протеаз (“Promega”, США), с добавлением лизоцима до конечной концентрации 1 мг/мл. Полученную суспензию инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Протопласты разрушали озвучиванием в ультразвуковом дезинтеграторе Vibra Cell™ UltrasonicProcessor («Sonics», США) при частоте 20 кГц трижды по 30 с интервалом между обработками 15 с при 4°C. Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 10 000 g. Для выделения везикул белки супернатанта центрифугировали в течение 1 ч при 4°C и 280 000 g, суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ MOPS, pH-7,5, 10 мМ MgCl₂, коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Германия) и центрифугировали в течение 1 ч при 4°C и 280 000 g. Полученные осадки растворяли в пяти объемах того же буфера с добавлением глицерина до 10%. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд. Фракцию инвертированных мембранных везикул замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Измерение АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул. Разработку тест-системы для определения ингибирующего действия производных олигомицина А на FoF1 АТФ-синтазу в инвертированных мембранных везикулах *S. fradiae* проводили, опираясь на методику, опубликованную в работе Koul A. et al., 2007 с небольшими модификациями. АТФ-синтазная активность определялась в выделенных инвертированных мембранных везикулах *S. fradiae* посредством активизации их с помощью NADH и измерения продуцируемой АТФ с использованием люциферин/люциферазной реакции.

Биоинформатические методы.

Последовательности генов были получены из базы данных GenBank NCBI.

Гомологию аминокислотной последовательности белков исследовали в программе BLAST. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega.

Для выявления ряда SNP, был проведен биоинформатический анализ, включающий в себя выравнивание генома мутантного штамма на геном штамма дикого типа с помощью программы GS reference mapper 3.0 (Roche).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема эксперимента определения возможных механизмов устойчивости к олигомицину А у актинобактерий *S. fradiae* ATCC 19609.

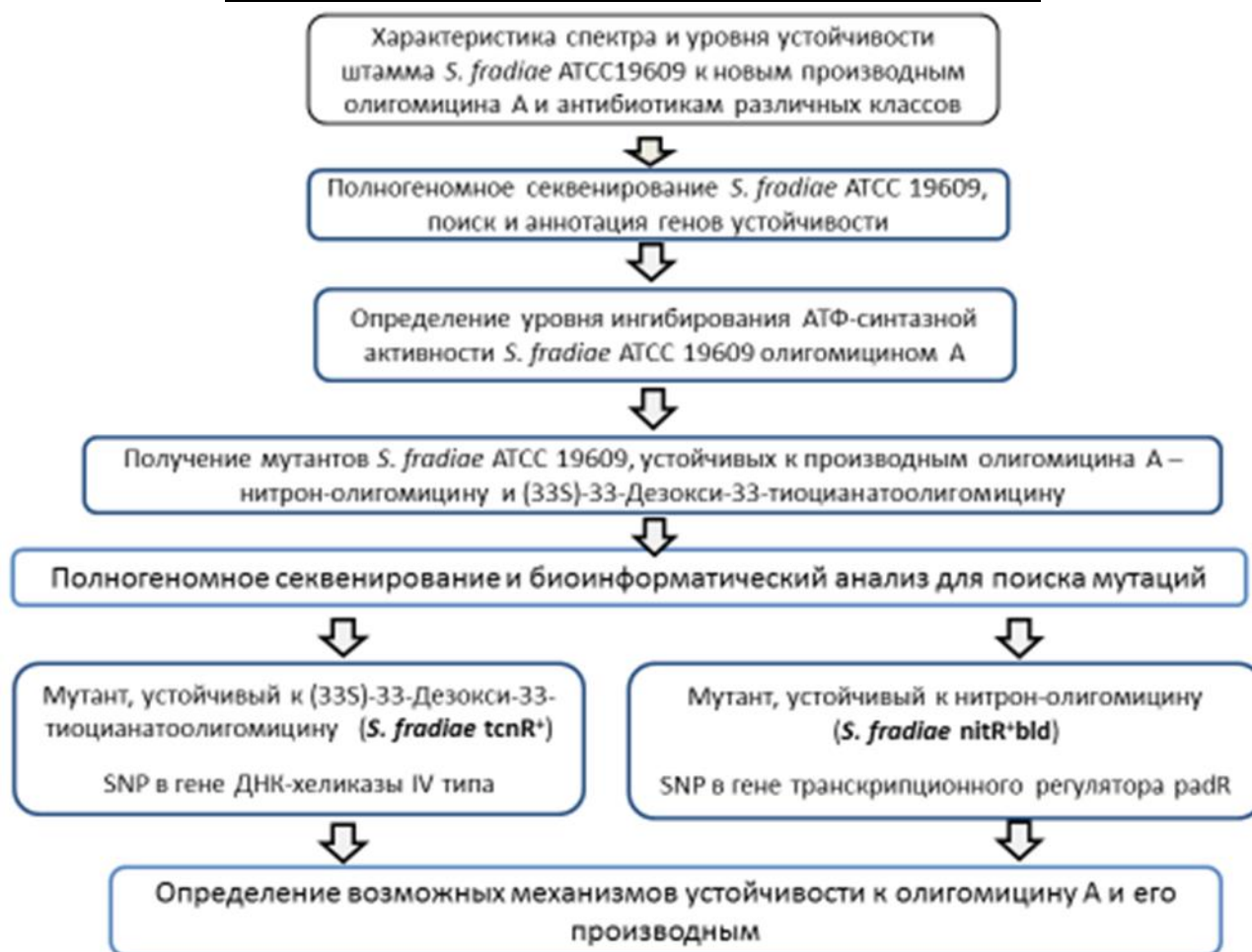


Рисунок 1. Схема эксперимента определения возможных механизмов устойчивости к олигомицину А у актинобактерий *S. fradiae* ATCC 19609.

Характеристика спектра устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к антибиотикам различных химических классов.

Штамм *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 интересен своей исключительной чувствительностью ко многим классам антибиотиков, таким как аминогликозиды, тетрациклины, оксазолидинон, хлорамфеникол, макролидный антибиотик олигомицин А и его производные, и другие гетероциклические антибиотики, по сравнению с модельным штаммом *S. lividans* 66, что делает его удобным для изучения механизмов устойчивости и чувствительности к широкому кругу антибиотиков.

Характеристика спектра устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к антибиотикам различных химических классов проведена методом дисков относительно модельного штамма *S. lividans* 66 и непатогенного штамма *S. albus* ATCC 21132. В большинстве случаев диаметры зон подавления роста *S. fradiae* ATCC 19609 антибиотиками больше, чем диаметры зон подавления роста *S. lividans* 66 и *S. albus* ATCC 21132, что говорит о более высоком уровне чувствительности *S. fradiae* ATCC 19609 к ряду антибиотиков различных химических классов.

В процессе настоящей работы было получено более 20 новых полусинтетических производных олигомицина А. Для определения влияния изменения химической структуры олигомицина А было проведено определение активности олигомицина А и его производных в тест-системе *S. fradiae* ATCC 19069 (Таблица 1). В результате тестирования установлено, что изомер олигомицина А по С-33 положению обладает на порядок сниженной активностью, чем олигомицин А, но при этом является наиболее активным веществом из всех тестируемых соединений.

Таблица 1. Активность производных олигомицина А в отношении штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609.

Химическое вещество	МИК нмоль/диск
Олигомицин А	0,001
(33S)-Олигомицин А (Olg 12)	0,01
Олигомицин-33-формаат (Olg 16)	0,05
33-О-мезилолигомицин, (Olg3)	0,1
(33S)-азидо-33-дезоксидолигомицин (Olg 2)	0,5
33-(R,S)-бромо-33-дезоксидолигомицин (Olg 5)	0,5
(33S)-33-дезоксидо-33-тиоцианатолигомицин (Olg4)	1
нитрон-олигомицин, (Olg1)	10
2,3,16,17,18,19-Гексагидроолигомицина А (Olg 17)	>10
Ретроальдольное расщепление олигомицина А по С8-С13 связям	100

Для подтверждения сверхчувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 были определены МИК олигомицина А и используемых в работе производных в отношении *S. fradiae* ATCC 19609, *S. albus* ATCC 21132 и *S. lividans* 66. Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 оказался наиболее чувствительным к олигомицину А, нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидо-33-тиоцианатолигомицину (Таблица 2.).

Таблица 2. Биологическая активность новых производных олигомицина на актинобактериях рода *Streptomyces*.

Вещество	МИК нмоль/диск		
	<i>S. fradiae</i> ATCC 19609, нм/диск	<i>S. albus</i> ATCC 21132	<i>S. lividans</i> 66
Олигомицин А	0,001	0,05	1
(33S)-33-дезоксидо-33-тиоцианатолигомицина	1	10	>100
нитрон-олигомицин	10	100	>100

На основании полученных данных можно сделать вывод, что существенным для активности полусинтетических производных является изменение в положении 33-го атома углерода в молекуле олигомицина А. Таким образом, полученные результаты выявили

важную роль 33-гидроксигруппы боковой цепи олигомицина А для биологических свойств антибиотиков этого ряда, что согласуется с данными рентгеноструктурного анализа комплекса олигомицина А с FoF1-АТФ-синтазой.

Определение ингибирующего действия олигомицина А на активность FoF1-АТФ-синтазы в везикулах *S. fradiae* ATCC 19609.

В нашей работе мы определяли ингибирующее действие олигомицина А на FoF1-АТФ-синтазу в инвертированных мембранных везикулах *S. fradiae* ATCC 19609 с использованием известных ингибиторов окислительного фосфорилирования в ранее разработанной тест-системе. Для определения ингибирующего действия олигомицина А проводилось изучение кинетики синтеза АТФ на модели инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*. Проводилось сравнение кинетики реакции синтеза АТФ FoF1-АТФ-синтазой интактных инвертированных мембранных везикул и предобработанных олигомицином А мембранных везикул. В качестве контроля проводили обработку известным ингибитором АТФ-синтазной активности дициклогексилкарбодиимидом (DCCD). Определение АТФ-синтазной активности проводилось с использованием набора АТР Bioluminescence Assay Kit HS II на основании уровня люминесценции АМФ в следующей реакции:



Единственная известная биомишень олигомицина А – FoF1-АТФ-синтаза. Полученные нами результаты позволили предположить низкую способность к ингибированию АТФ-синтазной активности олигомицином А относительно стандартного ингибитора DCCD, что в свою очередь косвенно может подтверждать наличие двух или более биомишеней олигомицина в клетке.

Для подтверждения полученных ранее результатов нами было проведено сравнение степени ингибирования АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*, предобработанных дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ). Диаграмма, отражающая сравнение ингибирующего действия DCCD и олигомицина А, представлена на Рисунке 2. Показано, что наибольшее ингибирующее влияние DCCD оказывает в течение первых 10 минут прохождения ферментативной реакции (105 - 74 %). Степень ингибирования олигомицином А достигает максимума к 10 мин и несколько снижается после 20 мин. Максимальная степень ингибирования олигомицином А составляет 31,3%. Уровень ингибирования АТФ-синтазной активности DCCD намного выше уровня ингибирования олигомицином А во всех временных отрезках эксперимента. В среднем DCCD является более чем в 2,5 раз более активным ингибитором, чем олигомицин А.

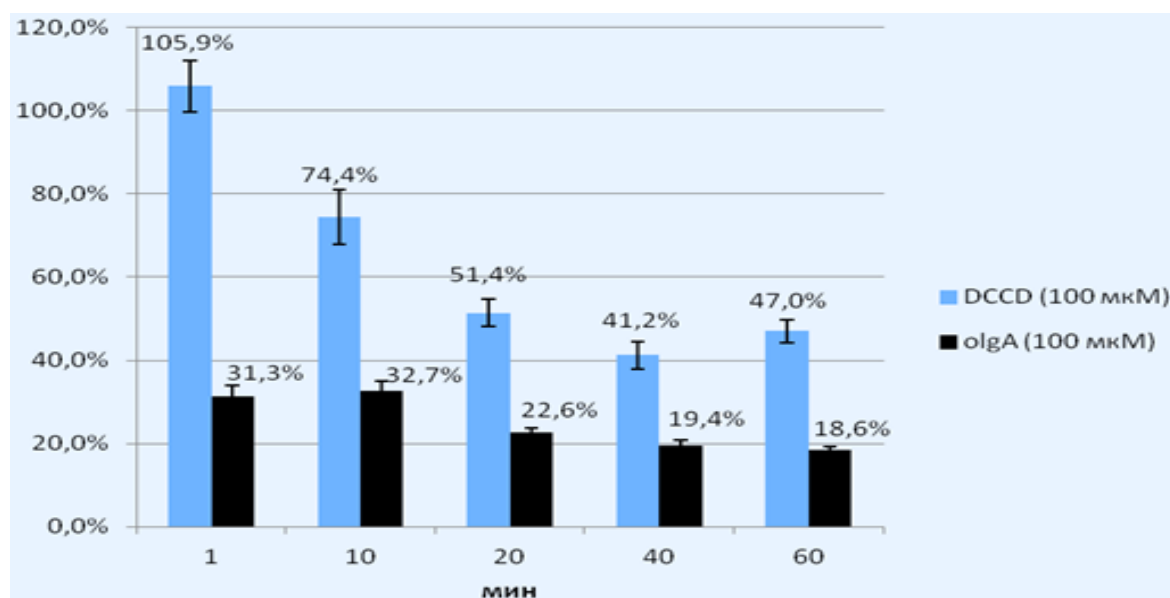


Рисунок 2. Степень ингибирования АТФ-синтазной активности FoF1-АТФ-синтазы в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*, предобработанных дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что олигомицин А ингибирует АТФ-синтазную активность в клетке не полностью (чуть более 30%), что в свою очередь подтверждает гипотезу о наличии нескольких биомишеней олигомицина А, и при этом АТФ-синтаза, возможно, не является основной биомишенью.

Полногеномное секвенирование генома *S. fradiae* ATCC 19609

Для анализа резистомы (совокупность генов, отвечающих за возникновение устойчивости к антибиотикам) было проведено полногеномное секвенирование генома *S. fradiae* ATCC 19609 с использованием системы Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). Геном был депонирован (JNAD000000000).

Биоинформатический анализ секвенированного генома *S. fradiae* ATCC 19609 выявил четыре группы генов, определяющих устойчивость к антибиотикам у стрептомицетов: гены инактивации антибиотиков путем модификации их структур (фосфотрансферазы, ацетилтрансферазы, бета-лактамазы); гены транспортных белков, осуществляющих выброс антибиотиков из клетки; гены транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию генов природной устойчивости (семейства *whiB*, *padR* и др.) и гены систем токсин/антитоксин, функционирование которых в стрессовых условиях переводит клетки в персистирующее состояние, что приводит к их толерантности к антибиотикам.

При сравнении аминокислотных последовательностей продуктов трех групп генов: генов устойчивости к антибиотикам, генов транспорта антибиотиков различных классов и генов семейства транскрипционных регуляторов, принимающих участие в осуществлении природной устойчивости *S. fradiae* ATCC 19609, *S. lividans* TK24 и *S. albus* J1074 было выявлено, что в геноме штамма *S. fradiae* ATCC 19609 отсутствуют ген устойчивости к тетрациклину *tetM*, ген устойчивости к бицикломицину и ген металло-β-лактамазы. Процент идентичности таких генов как *cmlR* (обеспечение устойчивости к хлорамфениколу), *macB* (обеспечение устойчивости к макролидным антибиотикам) и *drdA*, *drdR* (обеспечение

устойчивости к даунорубину) штамма *S. fradiae* ATCC 19609 и *S. lividans* TK24 не превышал 56%. В геноме *S. fradiae* с помощью биоинформатического анализа были обнаружены гены четырех MDR ABC транспортеров, имеющих АТФазную и пермеазную компоненты; восемь генов, разбросанных по геному АТФазных составляющих MDR ABC транспортеров, включая два гена устойчивости к даунорубину (*ddlC*, *brcA*) и ген устойчивости к макролидным антибиотикам *macB2*; пять генов непарных субъединиц пермеаз MDR ABC транспортеров; ген MDR-транспортера семейства *matE*, обеспечивающего устойчивость бактерий к моксифлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину; транспортера семейства MFS, способствующего устойчивости к бромистому этидию и гиромизину В; а также ген устойчивости к пуромизину семейства *emrB/qacA* и ген двусубъединичного MDR-ABC транспортера, гомологичного гену белка Pgp человека по всей длине гена с 54% подобия. Гомология аминокислотных последовательностей продуктов генов *mdr1* *S. lividans*, *S. fradiae* и *S. albus* составляет 75 и 81% соответственно. Идентичность белков (MDR)ABC-транспортеров варьирует от 26 до 82% у *S. fradiae* и до 94% у *S. albus*. Также в геноме *S. fradiae* были обнаружены гены транскрипционных регуляторов, которые могут быть вовлечены в процесс формирования устойчивости у бактерий – *whiB*, *padR*, *marR*, *lfrR*, *tetR*.

АТФ-зависимые ABC транспортеры (MDR) – трансмембранные белки, которые используют энергию АТФ для осуществления транслокации различных субстратов через мембраны из клеток. Эти клеточные насосы переносят широкий спектр субстратов, в том числе и антибиотики. ABC транспортеры участвуют в развитии резистентности ко многим лекарственным препаратам. Pgp (MDR1) является членом семейства АТФ-связывающих кассетных (ABC) транспортеров и играет физиологическую роль в здоровых клетках: выполняет барьерную функцию тканей и участвует в транспорте фосфолипидов в печени. Нарушение работы отдельных транспортеров или транскрипционных регуляторов может обуславливать возникновение сверхчувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609.

Получение мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А, их характеристика

Олигомицин А является высокоспецифичным ингибитором окислительного фосфорилирования в митохондриях эукариот, его действие приводит к остановке процесса синтеза АТФ. Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 сверхчувствителен к олигомицину А (<0,001 нмоль/мл или 0,0005 нмоль/диск) и его производным.

Попытки получить мутантные штаммы *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивые к олигомицину А проводились и в этой работе и были безуспешны. Поэтому возникло предположение о наличии нескольких биомиметов действия олигомицина А в *S. fradiae* ATCC 19609. Располагая серией полусинтетических производных олигомицина А, характеризующихся различной эффективностью для *S. fradiae* ATCC 19609, в настоящей работе мы получили мутантные штаммы, устойчивые к некоторым производным, а именно:

1. Нитрон-олигомицин (**Olg1**)
2. (33S)-33-дезоксидеоокси-33-тиоцианатоолигомицин (**Olg 4**)

В результате селекции был получен мутант, устойчивый к производному олигомицина А - нитрон-олигомицину – OlgR1, а также 8 мутантов, устойчивых к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину – Olg4R.

Частота возникновения мутантных штаммов, устойчивых к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину составляла $1,7 \cdot 10^{-9}$.

При проведении фенотипического анализа было выявлено, что фенотип устойчивых штаммов – спорулирующий, скорость роста такая же, как у штамма дикого типа. При проведении характеристики мутантного штамма *S. fradiae* tcnR⁺ по спектру устойчивости к антибиотику олигомицину А и его производным методом дисков было выявлено изменение устойчивости мутантного штамма к производным олигомицина А (Таблица 3).

Для штамма, устойчивого к нитрон-олигомицину, частота возникновения мутантов составляла $2 \cdot 10^{-10}$. В процессе фенотипического анализа штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld выявлено, что полученный штамм *S. fradiae*-nitR⁺bld—образовывает редкий воздушный мицелий и обладает сниженной способностью к споруляции (bald phenotype) и сниженной скоростью роста относительно штамма дикого типа, что позволяет предположить изменение экспрессии генов, участвующих в дифференциации *Streptomyces*, в том числе транскрипционных регуляторов семейства *bld* или *whi*, которые являются основными факторами транскрипции, необходимыми для формирования воздушного мицелия и нормального процесса споруляции у актинобактерий

Таблица 3. Сравнение уровня устойчивости штаммов *S. fradiae* ATCC 19609 и *S. fradiae* tcn⁺, *S. fradiae*-nitR⁺bld к производным олигомицина А.

Антибиотик	Концентрация, нм/мл	Зоны ингибирования роста, мм		
		<i>S. fradiae</i> ATCC 19609	<i>S. fradiae</i> tcn ⁺	<i>S. fradiae</i> -nitR ⁺ bld
Олигомицин А	0,01	12±1*	9.0±0.5*	12±1*
Нитрон-олигомицин (Olg1)	120	13±1	10±1	0
(33S)-33-Дезокси-33-тиоцианатоолигомицин (Olg4)	50	14±1	0	13±1

*Среднее значение ± стандартное отклонение, эксперимент проведен в 3 независимых повторях.

Полногеномное секвенирование мутантного штамма, устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину *S. fradiae* tcnR⁺, характеристика обнаруженной мутации

Для поиска изменений в геноме штамма *S. fradiae* tcnR⁺, которые привели к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину, проведено полногеномное секвенирование на платформе системы Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). Геном был депонирован NCBI (MCNU000000000). В процессе биоинформатического анализа геномов штаммов дикого типа и устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину, была выявлена единичная нуклеотидная замена С(1797)Т в гене хеликазы (KDS85476.1) NCBI, которая привела к замене аминокислоты А(600)Т в консервативном регионе P-loop NTPase. Эта мутация, возможно, привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину.

Данная хеликаза относится к IV классу ДНК-хеликаз, функции которых заключаются в участии в репликации, рекомбинации и репарации ДНК различных бактерий. Аминокислотные последовательности хеликаз IV класса гомологичны у актинобактерий по всей длине гена с % подобия от 43 до 94. Область, в которой произошла мутация, высоко консервативна у всех членов рода *Streptomyces* (Рисунок 3).

BAD	AVG	GOOD																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
-----	-----	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Рисунок 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей хеликазы IV исследуемого *S. fradiae* *tcn*^R (KDS85476.1), и хеликаз других видов бактерий, аннотированных в базе данных NCBI, имеющих наибольшую гомологию исследуемого региона P-loop_NTPase. Аминокислотная замена, которая привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину мутантного штамма A(600)T выделена. Выполнено в программе T-COFFEE, Version_11.00.d625267.

При этом у большинства стрептомицетов в этой точке аминокислотной последовательности хеликазы IV находится остаток треонина, в отличие от штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609, где присутствует остаток аланина. Метильная группа аланина является нереактивной и таким образом, почти никогда непосредственно не участвует в функционировании белка. Известно, что мутации в ДНК-хеликазе IV приводят к снижению ее активности, ингибируя активность ДНК-специфичных экзонуклеаз, участвующих в гомологической рекомбинации и репарации ДНК. Мы предполагаем, что аминокислотная замена (A(600)T) нефункционального остатка аланина на функциональный остаток треонина приводит к восстановлению функции хеликазы и возникновению устойчивости мутантного штамма к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину.

Полногеномное секвенирование мутантного штамма, устойчивого к нитрон-олигомицину *S. fradiae*-nitR⁺bld, характеристика обнаруженной мутации

Секвенирование генома проведено с использованием метода полногеномного секвенирования на платформе системы Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). Геном был депонирован (LGSP01000001). При проведении сравнительного биоинформатического анализа для поиска единичных нуклеотидных замен в геномах штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld и штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609 была идентифицирована мутация, приводящая к замене аминокислоты H(24)R в ДНК-связывающем консервативном районе, входящем в суперсемейство HTH, белка полифункционального транскрипционного регулятора двойного действия PadR (KDS89815.1), который у различных бактерий может быть вовлечен в контроль экспрессии генов, связанных с детоксикацией, вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью у бактерий.

При проведении дальнейшего анализа полученной SNP и генетической характеристики гена *padR* было установлено, что гены данного семейства присутствуют у большинства бактерий (Таблица 4). У представителей рода *Streptomyces* ген *padR*, в котором был найдена единичная нуклеотидная замена, имеет высокую степень гомологии по всей длине, при этом идентичность ДНК- связывающего домена составляет около 98%.

Таблица 4. Сравнительный биоинформатический анализ последовательностей белка семейства PadR *S. fradiae* ATCC 19609 и некоторых представителей рода *Streptomyces*.

Название микроорганизма	Номер белка в GenBank NCBI	Процент идентичности всей длины белка	Процент идентичности ДНК-связывающего домена
<i>S. albus</i>	WP_030545089.1	80%	99%
<i>S. pathocidini</i>	WP_05547425.1	62%	96%
<i>S. rapamycinicus</i>	NRRL5491.	60%	98%
<i>S. himastatinicus</i>	EFL23306.1	62%	98%
<i>S. bingchenggensis</i>	ADI07041.1	64%	98%
<i>S. avermitilis</i>	BAC70688.1	61%	98%
<i>S. rimosus</i>	WP_033033521.1	59%	98%

При поиске предполагаемых генов, регулируемых PadR, в геноме *S. fradiae* ATCC 19609 нами был обнаружен предполагаемая область связывания белка PadR. Область находится на расстоянии в 13 п.н. от стартового кодона гена *marR*-family transcriptional regulator (KNE81702.1) и имеет гомологию 70% ранее известной области связывания белка VanR, найденной в геноме *Corynebacterium glutamicum* (Рисунок 4).

```

bp                               -34                               0
marR                             agatacctaactcaggtatgcaaaaggaggtgtcatg
VanR binding site               AACTAACTAANTTAGGTATTT-----
                                *  **  *****  *  *****

```

Рисунок 4. Предполагаемый сайт связывания PadR *S. fradiae*.

Белок MarR (multiple antibiotic resistance regulator) вовлечен во множество процессов у *Streptomyces* и является глобальным регулятором транскрипции. Его гомологи широко распространены в бактериях и способны контролировать широкий спектр процессов, в том числе резистентность к антибиотикам (контроль мембранных транспортеров, отвечающих за выброс антибиотика из клетки), стрессовый ответ, вирулентность, катаболизм ароматических соединений, а также морфогенез, в том числе развитие воздушного мицелия и споруляцию. Они, как правило, действуют как репрессоры транскрипции, хотя иногда могут выступать в качестве активаторов или иметь двойной механизм - репрессии и активации.

Сравнительный протеомный анализ мутантного штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld и штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609

Для выявления качественных и количественных различий белков, контролируемых напрямую или опосредованно транскрипционным фактором PadR, был проведен двумерный электрофорез в ПААГ белковых фракций штамма дикого типа и штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld.

При проведении масс-спектрометрического анализа белковых фракций было выявлено количественное изменение некоторых белков штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld относительно белков штамма дикого типа в первой половине log фазы (Рисунок 7.8.). У штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld наблюдалось количественное увеличение белков двух ABC транспортеров, щелочной alkaline phosphatase, leucyl aminopeptidase и отсутствовала белковая фракция alanine dehydrogenase – фермента, вовлеченного в процесс спорообразования у стрептомицетов (Таблица 5). Эти данные указывают, что устойчивость *S. fradiae*-nitR⁺bld обусловлена работой транспортеров (WP_043466588.1, WP_043465859.1).

Таблица 5. Спектр качественных изменений белков и их характеристика у штаммов *S. fradiae*-nitR⁺bld и *S. fradiae* ATCC 19609.

Номер белка в GenBank NCBI, обозначение гена	Молекулярная масса (kDa)	Аннотация белка	Предполагаемая функция	Присутствие в штамме <i>S. fradiae</i>	
				ATCC 19609	nitR ⁺ bld
WP_043466588.1 PstS	39,319	phosphate ABC transporter substrate-binding protein	Выброс антибиотиков из клетки	-	+
WP_043465859.1 OppA	59,683	peptide ABC transporter substrate-binding protein	Выброс антибиотиков из клетки	-	+
WP_043468956.1 alkaline phosphatase D	57,761	Alkaline phosphatase	Транспорт неорганических ионов и метаболизм	-	+
WP_043470568.1 aminopeptidase A	51,676	Leucyl aminopeptidase	Негативный регулятор дифференциации.	-	+
WP_043468956.1 Ald	39,366	Alanine dehydrogenase	Вовлечен в процесс спорообразования	+	-

Изучение уровней экспрессии генов, ответственных за nitR-/bld- фенотип, штаммов *S. fradiae*-nitR⁺bld и *S. fradiae* ATCC 19609 методом ПЦР в реальном времени

Белки щелочной фосфатазы и alanine dehydrogenase на электрофореграмме (Рисунок 5) находятся в одной белковой фракции соответственно. Возникает вопрос: у которого из двух генов увеличивается уровень экспрессии? Определение количественного изменения уровня транскрипции генов проведено методом ПЦР в реальном времени. Сравнение уровней транскрипции этих генов мутантного штамма и штамма дикого типа проводилось в первой половине log фазы. Получены данные, свидетельствующие об изменении уровня транскрипции найденных генов. Мы обнаружили 6-кратное и 3-кратное увеличение экспрессии генов ABC-transporters, а также почти 3-кратное увеличение экспрессии генов alkaline phosphatase и leucyl aminopeptidase штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld. Ген alanine dehydrogenase штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld имел кратное уменьшение экспрессии в log фазе относительно штамма дикого типа, что соответствует результатам масс-спектрометрического анализа (Рисунок 6).

Это подтверждает предположение, что продукт гена *padR*, в котором мы обнаружили SNP в геноме мутантного штамма, может быть вовлечен в контроль транспорта антибиотика нитрон-олигомицина из клетки, а также в контроль других генов, отвечающих за морфологию, развитие воздушного мицелия и спорообразования.

Изменение уровня экспрессии генов *S. fradiae* nitR⁺bld в сравнении со штаммом *S. fradiae* ATCC 19609 в первой половине log фазы

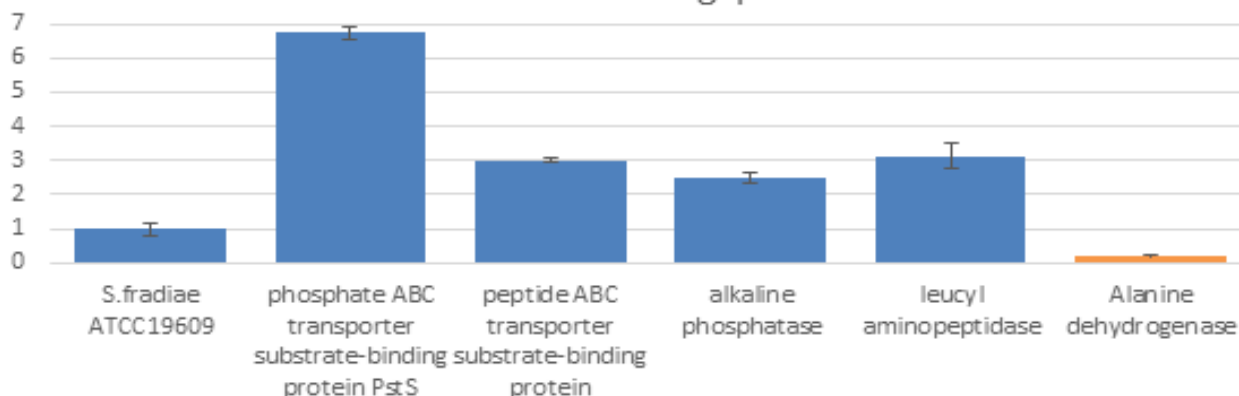


Рисунок 6. Относительная экспрессия генов *S. fradiae*-nitR⁺bld по сравнению с *S. fradiae* ATCC 19609 была рассчитана с использованием сравнительного метода Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), принимая экспрессию генов *S. fradiae* ATCC 19609 в качестве контроля (экспрессия штамма дикого типа принята за единицу), в первой половине log-фазы. Экспрессия целевых генов была нормирована на гены домашнего хозяйства.

Как было сказано выше, при определении фенотипа штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld нами выявлена слабая споруляция и рост, замедленный по сравнению с показателями штамма дикого типа. По литературным данным ген *whiB* является основным звеном процесса дифференциации и возникновения устойчивости к антибиотикам у стрептомицетов. При проведении сравнения экспрессии генов *whiB* штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld и штамма дикого типа – выявлен сниженный в 2,5 раза уровень экспрессии гена штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld. На основании этих данных можно также предположить наличие связи между регулятором PadR и геном *whiB*.

Для проверки предположения о регуляции PadR гена *marR* нами была проведена индукция штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld и штамма дикого типа нитрон-олигомицином в субингибирующих концентрациях. Индукция проводилась в начале log фазы, в качестве контроля использовался образец штамма дикого типа, выращенного без добавления нитрон-олигомицина. При индукции штамма дикого типа нитрон-олигомицином (в концентрации 50 нм/мл) мы наблюдали значимое изменение экспрессии гена *marR* (3-кратное в первый час после индукции и 4,5-кратное во второй час после индукции) в то время как у неиндуцированного штамма дикого типа экспрессия гена *marR* не изменялась (Рисунок 7). При индукции нитрон-олигомицином штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld мы не наблюдали изменения экспрессии гена *marR* (Рисунок 8).

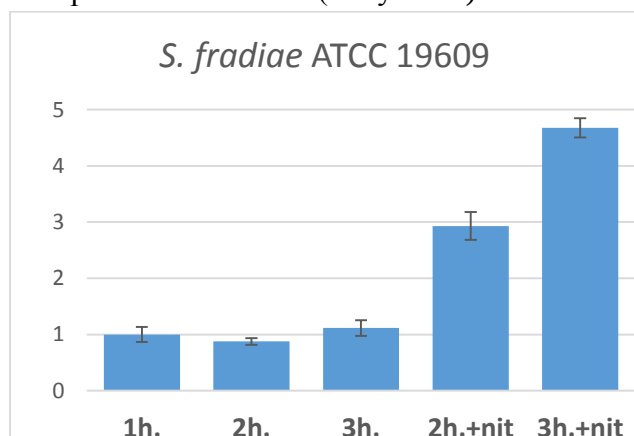


Рисунок 7. Изменение экспрессии гена *marR* *S. fradiae* ATCC 19609 при индукции его нитрон-олигомицином. Индукция штамма проводилась в log фазе.

1h. – нулевая точка, до начала индукции.

2h. 3h. – без индукции. (2 часа, 3 часа без индукции)

2h.+nit, 3h.+nit – исходный штамм с индукцией нитрон-олигомицином в двух временных точках (2 часа, 3 часа после индукции).

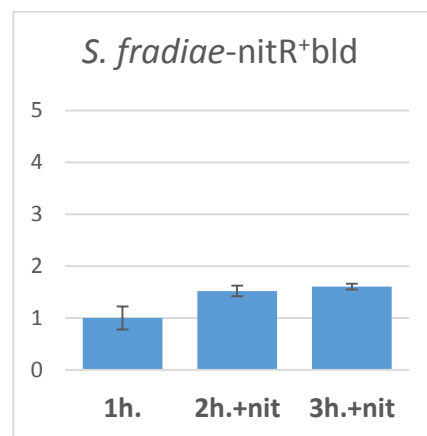


Рисунок 8. Изменение экспрессии гена *marR* *S. fradiae*-nitR⁺bld при индукции его нитрон-олигомицином. Индукция штамма проводилась в log фазе.

1h. – нулевая точка, до начала индукции.

2h.+nit, 3h.+nit – *S. fradiae* nitR⁺bld с индукцией нитрон-олигомицином в двух временных точках (2 часа, 3 часа после индукции).

Предполагаемая схема участия транскрипционного регулятора PadR в регуляции других генов *S. fradiae* ATCC 19609

BldD является основным фактором транскрипции, необходимым для формирования воздушных гиф у актинобактерий семейства стрептомицетов. Существует несколько генов, которые регулируются данным транскрипционным фактором – два гена сигма факторов (*whiG* и *bldN*) и ген транскрипционного фактора *bdtA*.

У стрептомицетов семейство генов *whi*, играет важную роль в формировании зрелых спор. Изучение генной сети при формировании спор выявило как минимум два гена сигма факторов (*whiG* и *sigF*) и других генов ряда транскрипционных факторов. Также существует отдельная группа генов, ответственная за формирование воздушного мицелия – гены *bld*, мутация в которых приводит к возникновению bald фенотипа. Гены *bld* кодируют разнообразные продукты, в том числе tPHK, ATP-binding cassette (ABC) membrane-spanning

transporter, сигма фактор и unrelated anti-anti-sigma factor, а также факторы транскрипции, *bldD* и *bldM*. Гены *bld* могут быть вовлечены в процессы продукции антибиотика и поглощение углерода. Эти функции указывают на глобальную регуляторную роль продуктов генов данного класса.

При проведении полногеномного секвенирования исходного штамма *S. fradiae* ATCC 19609 и его дальнейшего биоинформатического анализа были обнаружены два гена, возможно, вовлеченные в процесс дифференциации и спорообразования (XRE family transcriptional regulator - KDS84275.1, *whiB* - KDS86346.1). Однако при изучении уровня экспрессии данных генов мы обнаружили изменение только в экспрессии гена *whiB*.

На основании полученных нами данных можно предположить, что белок PadR опосредованно является транскрипционным регулятором множества генов, ответственных за формирование мицелия и спорообразования, и может быть вовлечен в контроль транспорта антибиотиков из клетки. Мы предполагаем, что белок PadR штамма *S. fradiae* ATCC 19609, мог быть вовлечен в позитивный контроль регулятора MarR. Мутация, которая произошла в ДНК-связывающем районе PadR и частичная инактивация белка PadR привела к нарушению экспрессии гена *marR*. Это повлияло на изменение экспрессии генов, позитивно контролируемых MarR: генов, отвечающих за образование воздушного мицелия и спорообразование; а также генов, негативно контролируемых MarR: к активации гена мембранного транспортера, выбрасывающего из клетки нитрон-олигомицин. Этим может быть обусловлена устойчивость мутантного штамма к нитрон-олигомицину. По результатам, полученным в данной работе, можно предположить, что экспрессия гена *whiB* (*WhiB* отвечает за морфогенез) регулируется либо белком PadR, либо другими транскрипционными факторами, регулируемые PadR, потому что при индукции нитрон-олигомицином уровень экспрессии гена *whiB* штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* почти в три раза ниже, чем у штамма дикого типа. Очевидно, что мутация в гене *padR* приводит к формированию bald phenotype, и что белок PadR играет важную функцию в нормальном развитии мицелия и спорообразования. Существует мнение, что ген alanine dehydrogenase является одним из множества генов, вовлеченных в процесс спорообразования, и возможно регулируется транскрипционным регулятором WhiA, относящимся к семейству *bld* транскрипционных регуляторов. Было показано, что в клетках штамма дикого типа ген alanine dehydrogenase экспрессируется в норме, тогда как у делецированного *whiA⁻* мутанта происходит снижение экспрессии гена alanine dehydrogenase на некоторых стадиях роста [Salerno et al., 2013]. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что транскрипционный регулятор PadR может быть вовлечен в регуляцию генов семейства *whi*, что, в свою очередь, и вызывает снижение экспрессии гена alanine dehydrogenase и изменение фенотипа штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* относительно штамма дикого типа. (Рисунок 7.13.)

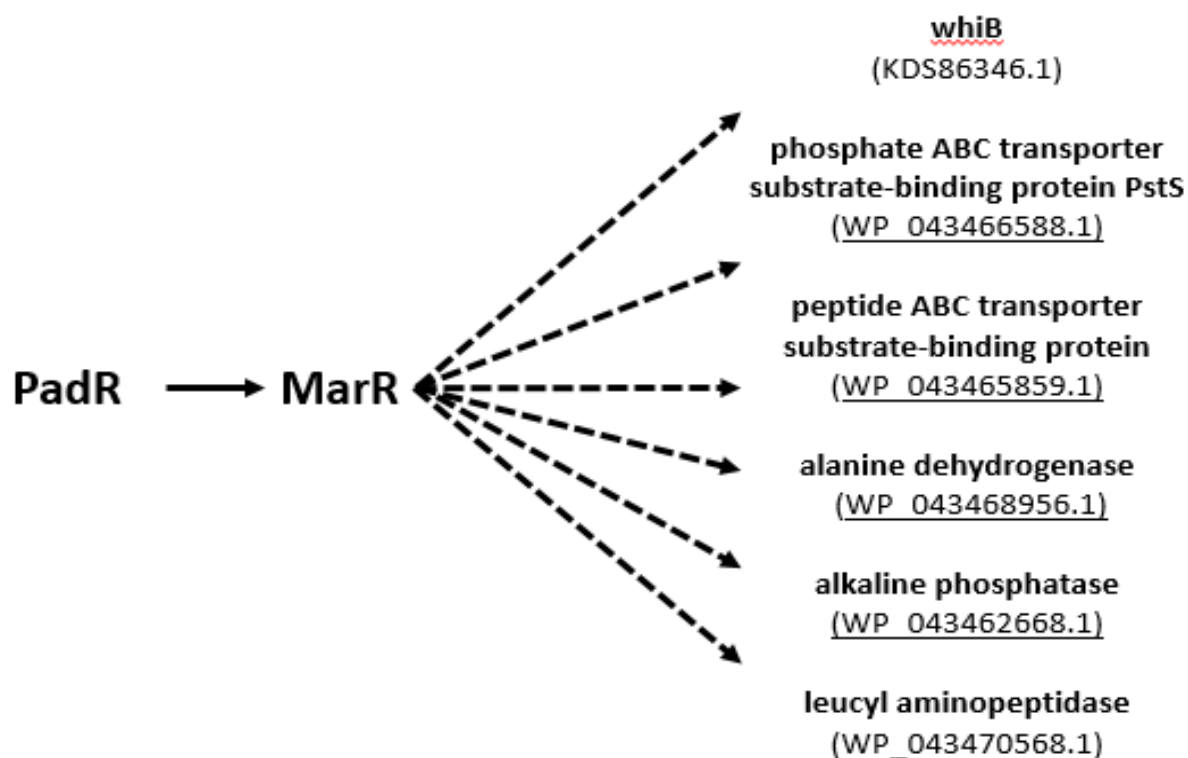


Рисунок 9. Предполагаемая схема участия транскрипционного регулятора PadR в регуляции других генов у *S. fradiae* ATCC 19609

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате работы валидирована тест-система на основе штамма *S. fradiae* ATCC 19609 для скрининга новых природных антибиотиков и их полусинтетических производных, в том числе активных в отношении патогенных штаммов бактерий, относящихся к роду *Actinobacterium* и *Corynebacterium*. Определены МИК олигомицина А и ряда его полусинтетических производных в отношении штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Данный штамм охарактеризован как сверхчувствительный к антибиотикам, по сравнению с модельным объектом *S. lividans* 66 и *S. albus* ATCC 21132.

Впервые секвенирован и депонирован в базе данных NCBI геном штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Проведен биоинформатический анализ генома сверхчувствительного к различным антибиотикам *S. fradiae* ATCC 19609, в процессе которого были обнаружены и аннотированы гены устойчивости к антибиотикам: гены четырех MDR ABC транспортеров, два гена устойчивости к даунорубину (*drmC*, *brcA*), ген устойчивости к макролидным антибиотикам *macB2*; пять генов непарных субъединиц пермеаз MDR ABC транспортеров; ген MDR транспортера семейства MatE, ген транспортера семейства MFS, а также ген пурамицин-устойчивого белка семейства EmrB/QacA и ген двусубъединичного MDR ABC транспортера, гомологичного гену белка Pgp человека.

Для изучения механизмов возникновения устойчивости к производным олигомицина А были получены мутантные штаммы *S. fradiae* ATCC19609, устойчивые к нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксид-33-тиоцианатоолигомицину. Проведено полногеномное секвенирование геномов этих мутантных штаммов. Геномы депонированы в системе NCBI (JNAD000000000, MCNU000000000). Комплексный сравнительный биоинформатический анализ геномов полученных мутантных штаммов позволил выявить мутации в гене ДНК-

хеликазы IV класса штамма, устойчивого к (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицину и мутацию в гене полифункционального транскрипционного регулятора PadR штамма, устойчивого к нитрон-олигомицину. Полученные результаты позволили установить механизмы возникновения устойчивости к производным олигомицина А.

Получены данные о неизвестном ранее механизме (мутация в гене хеликазы IV, которая привела к возникновению устойчивости *S. fradiae* ATCC19609 к (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицину), приводящем к уменьшению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам.

Дополнительно был проведен функциональный анализ PadR – было выявлено, что PadR возможно вовлечен в процесс регуляции отдельных генов устойчивости (MDR-транспортеры), а также в регуляцию генов, участвующих в спорообразовании стрептомицетов. Построена предполагаемая схема регуляции генов, вовлеченных в процесс спорообразования и выброса антибиотика из клетки, контролируемых PadR.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что штамм *S. fradiae* ATCC 19609 является сверхчувствительным к олигомицину А и его производным, по сравнению с модельным штаммом *S. lividans* 66.
2. Аннотированы гены, потенциально вовлеченные в процесс формирования устойчивости к антибиотикам штамма *S. fradiae* ATCC 19609.
3. Обнаружено, что штамм *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивый к нитрон-олигомицину обладает более низкой способностью к образованию воздушного мицелия и споруляции в отличие от штамма дикого типа. Штамм, устойчивый к (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицину фенотипически не отличается от исходного штамма.
4. Выявлена мутация в гене хеликазы IV класса штамма, устойчивого к (33S)-33-дезокс-33-тиоцианатоолигомицину, предположительно приведшая к возникновению устойчивости мутантов *S. fradiae* ATCC 19609.
5. Выявлена связь генотипа и фенотипа штамма *S. fradiae* ATCC 19609 устойчивого к нитрон-олигомицину с мутацией в гене *padR*. Построена схема регуляции генов, вовлеченных в процесс спорообразования и выброса антибиотика из клетки, контролируемых транскрипционным регулятором PadR.

В журналах рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. Lysenkova L.N., Godovikov I.A., Korolev A.M., Danilenko V.N., Bekker O.B., Mavletova D.A., **Vatlin A.A.**, Shchekotikhin A.E., Preobrazhenskaya M.N. Synthesis and anti-actinomycotic activity of the thiocyanato derivative of oligomycin A modified in the 2-hydroxypropyl side chain. // *Macroheterocycles*. 2015 8(4) 424-428
2. **Ватлин А.А.**, Беккер О.Б., Лысенкова Л.Н., Королев А.М., Щекотихин А.Е., Даниленко В.Н. Секвенирование и анализ резистомы *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 с целью разработки тест-системы для скрининга новых антибактериальных систем. // *Генетика*, 2016. 52(6): 723–727.
3. Shtil A.A., **Vatlin A.A.**, Maslov D.A., Danilenko V.N. FoF1 ATP synthase, a therapeutic target for aids associated lymphoma: design of new inhibitors. // *ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ И ИММУНОСУПРЕССИИ*. 2016. 8(2): 112-114
4. Bekker O.B., Klimina K.M., **Vatlin A.A.**, Zakharevich N.V., Kasianov A.S., Danilenko V.N. Draft genome sequence of *Streptomyces fradiae* ATCC 19609, a strain highly sensitive to antibiotics. // *Genome Announc.* 2014, 2(6):e01247-14. doi:10.1128/genomeA.01247-14.
5. **Vatlin A.A.**, Bekker O.B., Lysenkova L.N., Danilenko V.N. Draft genome sequence of *Streptomyces fradiae* olg1-1, a strain resistant to nitrore oligomycin. // *Genome Announc.* 2015, 3(5):e01252-15. doi:10.1128/genomeA01252-15.

Публикации в тезисах научных конференций:

1. МОБИХим 2015 – устный доклад: «Тест-система для скрининга и отбора новых природных и полусинтетических производных олигомицина А, перспективных антиактиномикозных препаратов, на основе *Streptomyces fradiae* ATCC 19609». 27-30 сентября 2015 г. Новый Свет, Крым. Сборник тезисов – стр. 81.
2. Омельчук О.А., Лысенкова Л.Н., Королев А.М., Надысев Г.Я., **Ватлин А.А.**, Беккер О.Б., Мавлетова Д.А. Модификация макролидного антибиотика олигомицина - ингибитора АТФ-синтазы (Тез. докл.) // Второй междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии "МОБИ-Хим2015", 27-30 сентября 2015, Крым, Новый Свет, с. 170.
3. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., **Ватлин А.А.**, Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы актинобактерий: структура и функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам у возбудителей туберкулеза и актиномикозов. III Международная научная конференция. «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» XI съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров. 23–25 ноября 2016 г. Минск, Республика Беларусь, с. 36. **Постерный доклад.**

Участие в конференциях:

1. Штиль А.А., Маслов Д.А., **Ватлин А.А.**, Даниленко В.Н. Участие во встрече рабочей группы США-Россия по профилактике и лечению ВИЧ-инфекции и сопутствующих заболеваний. Тезисный доклад: FoF1 ATP synthase, a therapeutic target for aids associated lymphoma: design of new inhibitors. 13-15 апреля 2016 г. Санкт-Петербург, Россия.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность зав. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, д.б.н., проф. **Валерию Николаевичу Даниленко** и с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, к.б.н. **Ольге Борисовне Беккер** за наставничество и вдумчивое руководство работой.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаборатории генетики микроорганизмов за постоянную поддержку, а в частности:

Диларе Анваровне Мавлетовой и **Людмиле Михайловне Князевой** за помощь на разных стадиях выполнения работы;

Наталье Владимировне Захаревич за помощь в освоении биоинформатических методов;

Ксении Михайловне Климиной, **Маслову Дмитрию Антоновичу** и **Кириллу Владимировичу Шуру**.

Автор благодарит научных сотрудников лаборатории химической трансформации антибиотиков Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им Г.Ф. Гаузе, заведующего лабораторией, д.х.н. **Андрея Егоровича Щекотихина** и с.н.с., к.б.н. **Людмилу Николаевну Лысенкову**.

Отдельно автор выражает благодарность к.б.н., заведующему лаборатории функциональной геномики **Брускину Сергею Александровичу** и к.б.н., заведующей лабораторией генетики микроорганизмов ФГУП ГосНИИ Генетики **Воейковой Татьяне Александровне** за замечания, сделанные при рецензировании данной работы перед ее апробацией.