

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Ватлин Алексей Александрович

Исследование генетических механизмов устойчивости и чувствительности
штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным

03.02.07 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

В.Н. Даниленко

Москва 2017

Содержание

Введение	6
Глава 1. Макролидные антибиотики	13
1.1. Механизм действия антибиотиков различных химических классов.....	13
1.2. Макролидные антибиотики – их классификация, механизмы действия.....	15
1.3. Макролидные антибиотики класса олигомицинов	16
1.4. <i>Streptomyces fradiae</i> как продуцент макролидного антибиотика тилозина	18
Глава 2. Механизмы устойчивости к макролидным антибиотикам.....	20
2.1. Механизмы возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам ..	20
2.2. Метилирование рибосомального сайта связывания антибиотика	22
2.3. Возникновение мутации в сайте связывания	23
2.4. Выброс антибиотика из клетки.....	23
2.5. Модификация антибиотиков в клетке	27
2.6. Устойчивость к макролидным антибиотикам <i>S. fradiae</i> , обусловленная способностью продуцировать тилозин	28
Глава 3. Известные механизмы действия олигомицина А на эукариотческие и бактериальные клетки.....	30
3.1. АТФ-синтаза – биомишень действия олигомицина А у эукариот.....	30
3.2. Классификация различных АТФ-синтаз.....	31
3.3. FoF1-АТФ-синтаза	32
3.4. Механизм синтеза и гидролиза АТФ	34
3.5. АТФ-синтаза как перспективная биомишень	37
3.6. Механизм связывания олигомицина А и С-субъединицы FoF1-АТФ-синтазы.	38
Глава 4. Антибиотики группы олигомицинов. Механизмы чувствительности актинобактерий	42
4.1. Антибиотик олигомицин А и его производные, механизмы их действия у актинобактерий	42

4.2. Чувствительность и устойчивость к олигомицину А бактерий, включая актинобактерии	45
4.3. Тест система на основе <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 для определения активности производных олигомицина А и поиска новых возможных биомишеней	46
4.4. Противоопухолевая активность олигомицина А и его производных.....	48
Глава 5. Существующие подходы поиска новых биомишеней	50
5.1. Понятие биомишени при создании лекарственных средств	50
5.2. Лекарственные средства и классификация их биомишеней	51
5.3. Проблема поиска новых биомишеней	53
Глава 6. Материалы и методы.....	54
6.1. Штаммы бактерий.....	54
6.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе	54
6.3. Культивирование бактерий	56
6.4. Методика определения антибактериальной активности веществ	57
6.5. Получение штаммов <i>S. fradiae</i> ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А.	57
6.6. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами	58
6.6.1. Выделение тотальной ДНК.....	58
6.6.2. Выделение РНК.....	58
6.6.3. Полногеномное секвенирование полученного штамма.....	59
6.6.4. Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля	59
6.6.5. Очистка ДНК из реакционной смеси	59
6.6.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	59
6.6.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	60
6.6.8. Определение количества ДНК.....	60
6.7. Манипуляции с белками.....	61
6.7.1. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях	61
6.7.2 Двумерный электрофорез и масс-спектрометрический анализ	61
6.8. Синтез кДНК и ПЦР в реальном времени	62
6.9. Биоинформатические методы	62
6.10. Получение препаратов инвертированных мембранных везикул <i>S. fradiae</i> ATCC 19609	63

6.11. Измерение АТФ-синтазной активности в препаратах инвертированных мембранных везикул.....	64
Глава 7. Результаты и обсуждение.	66
7.1. Экспериментальная схема исследования.	66
7.2. Характеристика спектра устойчивости штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 к антибиотикам различных химических классов.	68
7.3. Характеристика устойчивости штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 к олигомицину А и его производным	70
7.4. Определение ингибирующего действия олигомицина А на активность FoF1-АТФ-синтазы в везикулах <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	77
7.5. Определение уровня чувствительности (устойчивости) к новым производным олигомицина А на линии культур клеток	81
7.6. Полногеномное секвенирование генома <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	82
7.7. Аннотация генов устойчивости к антибиотикам в геноме <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 и выявление их ортологов в геноме <i>S. lividans</i> ТК24 и <i>S. albus</i> J1074	83
7.8. Получение мутантов штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А	88
7.8.1. Получение и характеристика <i>tcnR</i> ⁺ мутанта устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину у <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	90
7.8.2. Получение и характеристика <i>nitR</i> ⁺ мутанта, устойчивого к нитрон-олигомицину А, <i>S. fradiae</i> ATCC 19609	91
7.9. Полногеномное секвенирование мутанта, устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину <i>S. fradiae tcnR</i> ⁺	92
7.10. Изучение функции гена хеликазы у мутантного штамма <i>S. fradiae tcnR</i> ⁺ ..	93
7.10.1. Биоинформатический анализ гена хеликазы штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609.....	94
7.11. Полногеномное секвенирование мутанта, устойчивого к нитрон-олигомицину <i>S. fradiae-nitR</i> ⁺ <i>bld</i>	97
7.12. Характеристика мутантного штамма <i>S. fradiae-nitR</i> ⁺ <i>bld</i> . Протеомный и транскрипционный анализ	98
7.12.1. Распространение и функции гена <i>padR</i> у Грам ⁺ бактерий.....	99
7.12.2. Сравнительный протеомный анализ мутантного штамма <i>S. fradiae-nitR</i> ⁺ <i>bld</i> и исходного штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609	101
7.12.3 Изучение уровня экспрессии генов, ответственных за <i>nitR</i> и <i>bald</i> фенотип, у мутантного штамма <i>S. fradiae-nitR</i> ⁺ <i>bld</i> и исходного штамма <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 методом ПЦР в реальном времени	103

7.12.4. Изучение уровня экспрессии гена <i>marR</i> <i>S. fradiae</i> -nitR ⁺ bld и <i>S. fradiae</i> ATCC 19609 при индукции нитрон-олигомицином.....	105
7.12.5. Предполагаемая схема участия транскрипционного регулятора PadR в регуляции других генов у <i>S. fradiae</i> ATCC 19609	107
Заключение.....	110
Выводы.....	112
Список сокращений.....	113
Список литературы.....	114
Приложение 1.....	137
Благодарности.....	141

Введение

Комплекс олигомицинов, включая олигомицин А, относящийся к классу макролидных антибиотиков [Smith et al., 1954] впервые был выделен в 1954 году из культуры *Streptomyces diastatochromogenes*. Существует большое количество антибиотиков класса олигомицинов, в том числе олигомицины А, В, С, Е, F, D, ругамицин А, В и другие. Механизм действия олигомицина А и его аналогов у эукариотических и бактериальных клеток связывают с ингибированием клеточной активности АТФ-синтазы. Макролидный антибиотик олигомицин А и его аналоги демонстрируют противоопухолевую активность, а также оказывают антимикробное действие на некоторые грамположительные бактерии, в том числе на патогенные штаммы, вызывающие актиномикоз, однако, возможность использовать олигомицин А в качестве лекарственного средства при проведении химиотерапии или лечении инфекционных заболеваний ограничено его токсичностью. На данный момент ведутся работы по получению новых полусинтетических производных олигомицина А, в структурах которых было проведено направленное изменение функциональных групп, что поможет снизить его токсичность с сохранением терапевтических свойств [Lysenkova et al., 2015; Lysenkova et al., 2009; Lysenkova et al., 2013]. Эти производные синтезированы в лаборатории химической трансформации антибиотиков в научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (НИИНА им. Г.Ф. Гаузе). Вещества предполагается использовать для обнаружения новых биомишеней и установления детального механизма взаимодействия олигомицина с ними, в том числе FoF1-АТФ-синтазой.

Олигомицин А, связываясь с С-субъединицей, селективно подавляет транслокацию протонов в FoF1-АТФ-синтазе митохондрий эукариотов и цитоплазматическом комплексе FoF1-АТФ-синтазы бактерий, что приводит к нарушению энергетического обмена [Cole et al., 2005; Shchepina et al., 2002]. При этом FoF1-АТФ-синтаза является высококонсервативным ферментом как у

бактерий, так и у человека. Сегодня известно много механизмов возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам, в том числе: модификация биомишени антибиотика путем метилирования или возникновения мутации в сайте связывания биомишени в клетке, выброс антибиотика из клетки или его модифицирование, которое приводит к его инактивации.

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609, производные которого используются как промышленный продуцент тилозина, является сверхчувствительным к большинству известных антибиотиков, в том числе к олигомицину А (<0.001 нмоль/мл или 0.0005 нмоль/диск). При этом патогенные штаммы рода *Corynebacterium* и *Actinobacterium* обладают сниженной чувствительностью к данному антибиотику. Сверхчувствительность штамма *S. fradiae* ATCC 19609 может быть обусловлена несколькими механизмами действия и наличием нескольких биомишеней олигомицина А, а также его способностью к проникновению в клетку и отсутствием селективных механизмов выброса антибиотика из клетки *S. fradiae*, в частности обусловленных MDR системами.

По имеющимся литературным данным в клетках существует несколько биомишеней олигомицина А, по крайней мере в клетках эукариот [Wender et al., 2006]. Таким образом выявление новых потенциальных внутриклеточных мишеней позволит понять природу сверхчувствительности данного штамма, а также исследовать механизмы возникновения устойчивости у бактерий к олигомицину А и его производным.

Следует отметить, что попытки получить мутанты устойчивые к олигомицину А у *S. lividans* 66 и *S. fradiae* ATCC 19609 были безуспешны. Новые синтезированные производные обладают сниженной активностью в сравнении с олигомицином А в тест-системе *S. fradiae* ATCC 19609. Можно предположить, что это обусловлено отсутствием их способности воздействовать на некоторые биомишени олигомицина А и (или) способностью систем проницаемости клетки или осуществлением селективного выброса антибиотика из клетки. Поэтому синтезированные новые производные были использованы в работе для получения

мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А, для дальнейшего биоинформатического анализа их генома с целью выявления единичных нуклеотидных замен в возможных генах-кандидатах в биомишени, а также установления механизма возникновения устойчивости. Для изучения механизмов устойчивости к новым производным олигомицина А планируется провести транскрипционный и протеомный анализ клеток бактерий мутантного штамма, устойчивого к производному олигомицина А. Планируется изучение уровня экспрессии генов, потенциально вовлеченных в процесс формирования устойчивости к производным олигомицина А и генов, отвечающих за морфологическую дифференциацию, с помощью методов количественной ПЦР.

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 работы.

Впервые проведено полногеномное секвенирование и аннотация генома штамма *S. fradiae* ATCC 19609, синтезирующего антибиотик тилозин, используемый в ветеринарии.

Впервые выявлен механизм возникновения устойчивости к производным олигомицина А – нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидезокси-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 обусловленный транскрипционным регулятором PadR, и роль PadR в регуляции ABC – транспортеров. Впервые установлена биомшень действия (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицина – хеликазы IV, которая также приводит к повышению устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А в 10 раз.

Работа направлена на изучение механизма действия олигомицина А и его новых полусинтетических производных (поиск новых дополнительных биомшеней), а также изучение механизмов формирования резистентности актинобактерий к этому классу антибиотиков.

Практическая значимость.

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 и полученные мутантные штаммы, устойчивые к производным олигомицина А, могут быть использованы как комплексная тест-система для проверки активности новых природных антибиотиков и их полусинтетических производных, в том числе активных в

отношении патогенных штаммов бактерий, таких как *Actinomyces graevenitzii*, *A. gerencseriae*, *A. urogenitalis*, *Nocardia brasiliensis*, *Propionibacterium propionicum*, *N. asteroides*, *Streptomyces albus* и другие.

Впервые выявлен один из механизмов (мутация в гене хеликазы, которая привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину), приводящий к уменьшению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам. Мутация по этому гену может быть введена в штаммы, используемые при промышленной продукции тилозина для повышения стабильности продукции антибиотика.

Некоторые впервые установленные механизмы устойчивости к производным олигомицина А у 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. Впервые выявлены гены, отвечающие за формирование резистентности у штамма *S. fradiae* ATCC 19609 - гены четырех MDR ABC транспортеров, два гена даунорубицин-устойчивого белка (DrrC, 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 пурамицин-устойчивого белка 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 нитро-олигомицину А обусловлен мутацией в гене *padR* – полифункциональном транскрипционном регуляторе.

4. Олигомицин А является слабым ингибитором АТФ-синтазной активности *S. fradiae* ATCC 19609.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

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 резистома *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 с целью разработки тест-системы для скрининга новых антибактериальных систем. // *Генетика*, 2016. Т. 52, № 6, с. 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. Беккер О.Б., **Ватлин А.А.**, Лысенкова Л.Н., Щекотихин А.Е., Даниленко В.Н. Полногеномное секвенирование и анализ мутаций штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609-Olg4R, устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатолигомицину А. // *Генетика*. 2017, Т.53, №2.
5. 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.
6. **Vatlin A.A.**, Bekker O.B., Lysenkova L.N., Danilenko V.N. Draft genome sequence of *Streptomyces fradiae* olg1-1, a strain resistant to nitro oligomycin. // *Genome Announc.* 2015, 3(5):e01252-15. doi:10.1128/genomeA01252-15.

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

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. **Устный доклад Ватлина АА.**
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-синтетазы (Тез. докл.) // Второй междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии "МОБИ-Хим2015", 27-30 сентября 2015, Крым, Новый Свет, с. 170. Постерный доклад
3. Lysenkova L. N., Godovikov I. A, Korolev A. M, Danilenko V. N., Bekker O.B., Mavletova D.A., **Vatlin A.A.**, Shchekotikhin A.E. Modification of macrolide antibiotic oligomycin - inhibitor of ATP synthase. "FMC-ASMC 15-6th-EFMC International Symposium on Advances in Synthetic-and Medicinal Chemistry". November 15-18, 2015, Rehovot, Israel. Постерный доклад
4. 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. Постерный доклад.
5. 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.

Глава 1. Макролидные антибиотики

1.1. Механизм действия антибиотиков различных химических классов

В числе различных низкомолекулярных соединений присутствующих на рынке медицинских препаратов важнейшими лекарственными средствами являются антибиотики, которые используются для лечения инфекционных заболеваний, вызываемых в основном различными патогенными микроорганизмами, в том числе бактериями. Классический механизм действия антибиотиков на клетку предполагает накопление антибиотика в клетке и его связывании с той или иной клеточной биомишенью, что приводит к ее инактивации (биомишенью обычно являются ферменты, жизненно необходимые микробной клетке). Связыванию антибиотика и биомишени может препятствовать возникновение мутаций в гене, кодирующем фермент-биомишень. Из-за неизбежного возникновения новых механизмов устойчивости к антибиотикам у бактерий, разработка новых антибиотиков имеет важное значение. Рассмотрим основные наиболее распространенные механизмы действия антибиотиков (Рисунок 1.1.):

1. Ингибирование синтеза пептидогликана. Антибиотики с таким механизмом действия нарушают синтез клеточной стенки бактерий путем блокировки переноса пептидогликановых мономеров, синтезированных в цитоплазме, через цитоплазматическую мембрану, или ингибировании транспептидазы и, следовательно, образование пептидных сшивок, или путем блокирования обоих ферментов трансгликозидазы и транспептидазы. Трансгликозидазы имеют большое значение для образования гликозидных связей между сахарами и транспептидазами, что в свою очередь влияет на формирование пептидных поперечных связей [McManus, 1997]. Данным механизмом действия обладают многие классы антибиотиков – такие как гликопептидные, β -лактамные антибиотики и другие.

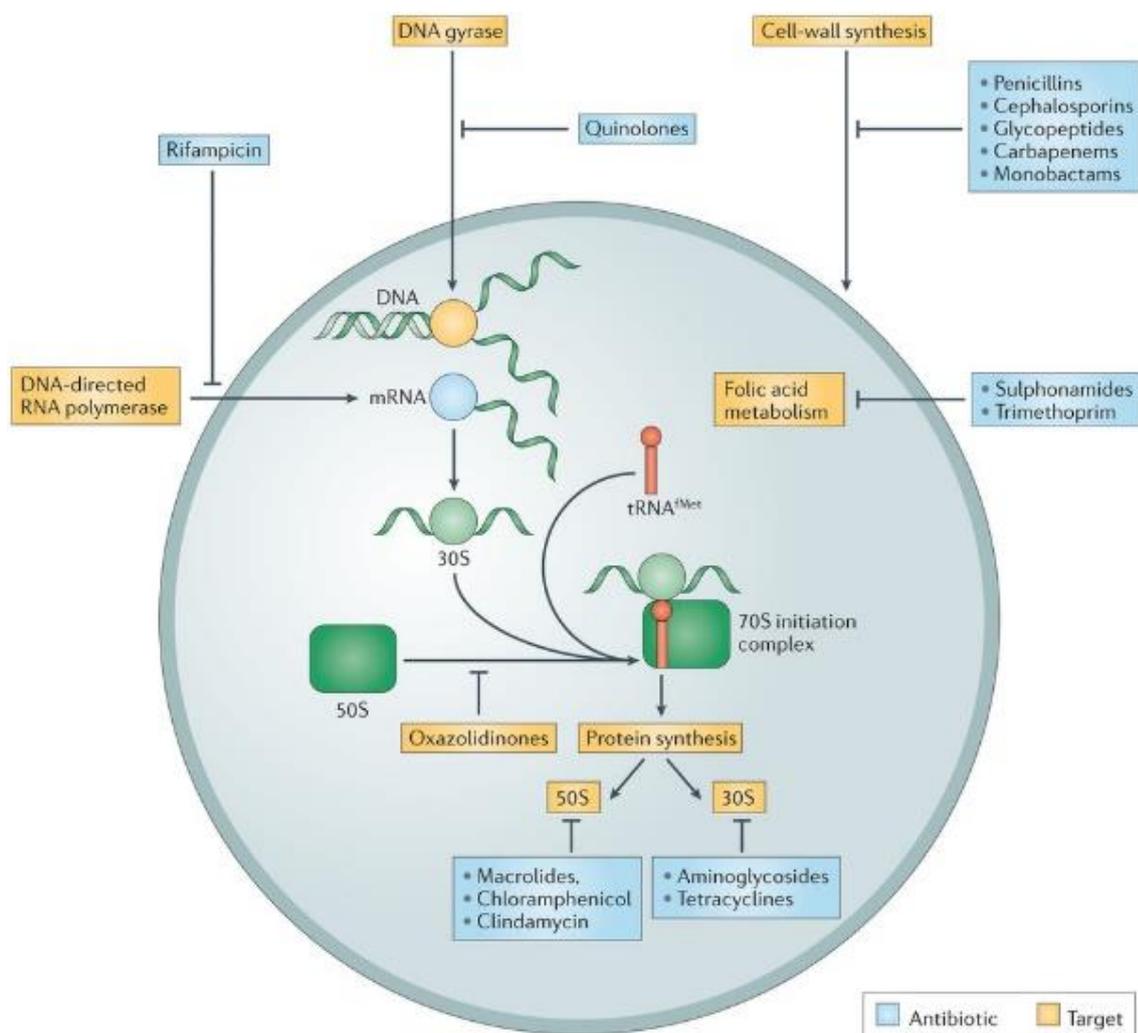


Рисунок 1.1. Биомишени антибактериальных лекарственных средств. Основные наиболее распространенные механизмы действия антибиотиков, а именно существует пять основных антибактериальных лекарственных мишеней в бактериальных клетках: механизм синтеза клеточной стенки, ДНК-гиразы, метаболические ферменты, РНК-полимеразы и механизмы синтеза белка. [Coates et al., 2002].

2. Функциональное изменение микробной цитоплазматической мембраны. К этому классу относятся антибиотики группы полимиксинов. Основной структуры таких антибиотиков являются катионные пептиды, состоящие из циклического пептида и жирных кислот. Взаимодействие между катионным пептидом и клеточной мембраной вызывает разрушение мембраны бактериальной клетки и повышает проницаемость клеточных компонентов [Hancock et al., 1999].

3. Изменение процесса трансляции. Многие антибиотики обладают функцией связывания с бактериальными рибосомами. Антибиотики классов аминогликозидов и тетрациклинов связываются с 30S рибосомальной субъединицей и предотвращают связывание тРНК [Brodersen et al., 2000; Carter et al., 2000]. Макролидные антибиотики (такие как эритромицин) и некоторые другие, связываются с 50S рибосомальной субъединицей и препятствуют ее выходу из ядра клетки [Schlünzen et al., 2001].
4. Ингибирование репликации нуклеиновых кислот путем блокировки топоизомеразы, необходимой для релаксации сверхспирализованных молекул ДНК, репликации бактериальной ДНК и расплетания кольцевой бактериальной ДНК. К этому классу относятся антибиотики фторхинолоны, которые ингибируют действие топоизомеразы или ДНК-гиразы [Maxwell, 1997].
5. Ингибирование транскрипции. Некоторые антибиотики, такие как рифампицин, связываются с РНК-полимеразой и ингибируют образование мРНК по матрице ДНК в процессе транскрипции [Spratt, 1994].

1.2. Макролидные антибиотики – их классификация, механизмы действия

Термин "макролид" используется для описания препаратов, химическая структура которых представлена макроциклическим 12- или более членным лактонным кольцом [Mazzei T, Mini E, Novelli A, 1993]. Этот класс соединений включает в себя множество биологически активных веществ, в том числе антибиотики, противогрибковые препараты, прокинетика и иммунодепрессантов. 14-, 15- и 16-членные макролиды являются широко используемым семейством антибиотиков. Они отлично проникают в ткани и обладают высокой противомикробной активностью, преимущественно в отношении

грамположительных кокков и атипичных возбудителей [Bearden et al., 1999]. Эритромицин А - 14-членный макролид, который был выделен более 50 лет назад из культур *Streptomyces* и был первым макролидным антибиотиком внедренным в клиническую практику [Mazzei T, Mini E, Novelli A, 1993]. К классу макролидных антибиотиков относят такие химические вещества как: азитромицин, кларитромицин, телитромицин, эритромицин, карбомицин, олеандомицин, спирамицин, тилозин, рокситромицин, олигомицин А и другие. Механизм действия макролидных антибиотиков основан на ингибировании синтеза белка в клетке. Макролидный антибиотик обратимо связывается с Р сайтом 50S субъединицы бактериальной рибосомы. Считается, что ингибирование происходит благодаря предотвращению добавления следующей аминокислоты пептидилтрансферазой к растущему пептид, присоединенному к тРНК [Tenson et al., 2003] (похожим механизмом действия обладает хлорамфеникол [Drainas et al., 1987]), а также ингибированию процесса трансляции. Другой потенциальный механизм заключается в преждевременной диссоциации пептидил-тРНК из рибосомы [Tenson et al., 2003].

1.3. Макролидные антибиотики класса олигомицинов

Антибиотики класса олигомицинов относятся к макролидам, содержащим 26-членный α , β -ненасыщенный лактон сопряженный с диенами, конденсированным с бициклической спирокетальной кольцевой системой. Олигомицин А, В и С были изолированы из *Streptomyces diastatochromogenes* в 1954 [Smith et al., 1954]. Основные продукты, А, В, С – олигомицины, при их синтезе клетками находятся в различных пропорциях в зависимости от штамма, условий культивирования и выделения [Kim, B. S., Surk Sik Moon, S. S. & Hwang, 1999].

На данный момент известно множество различных антибиотиков сходной структуры, относящихся к классу олигомицинов (А, В, С, Е, F, D, рутамицин А, В и другие). (Рисунок 1.2.). Механизм действия олигомицина А заключается в

селективном подавлении транслокации протонов в FoF1-АТФ-синтазе митохондрий эукариотов и цитоплазматическом комплексе FoF1-АТФ-синтазы актинобактерий, что приводит к нарушению энергетического обмена. Олигомицин А обладает цитотоксическим действием в отношении ряда патогенных бактерий рода *Actinobacterium* благодаря инактивации FoF1-АТФ-синтазы – перспективной биомишени для современных лекарственных препаратов [Ahmad et al., 2013]. По имеющимся данным олигомицин А имеет несколько неизученных биомишеней в бактериальной клетке отличных от FoF1-АТФ-синтазы [Wender et al., 2006]. Олигомицин А и его аналоги также демонстрируют стабильную противоопухолевую активность [Kim et al., 1997; Kobayashi et al., 1987; Yamazaki et al., 1992]. Однако, использование олигомицина А для химиотерапии инфекционных заболеваний ограничено его высокой токсичностью.

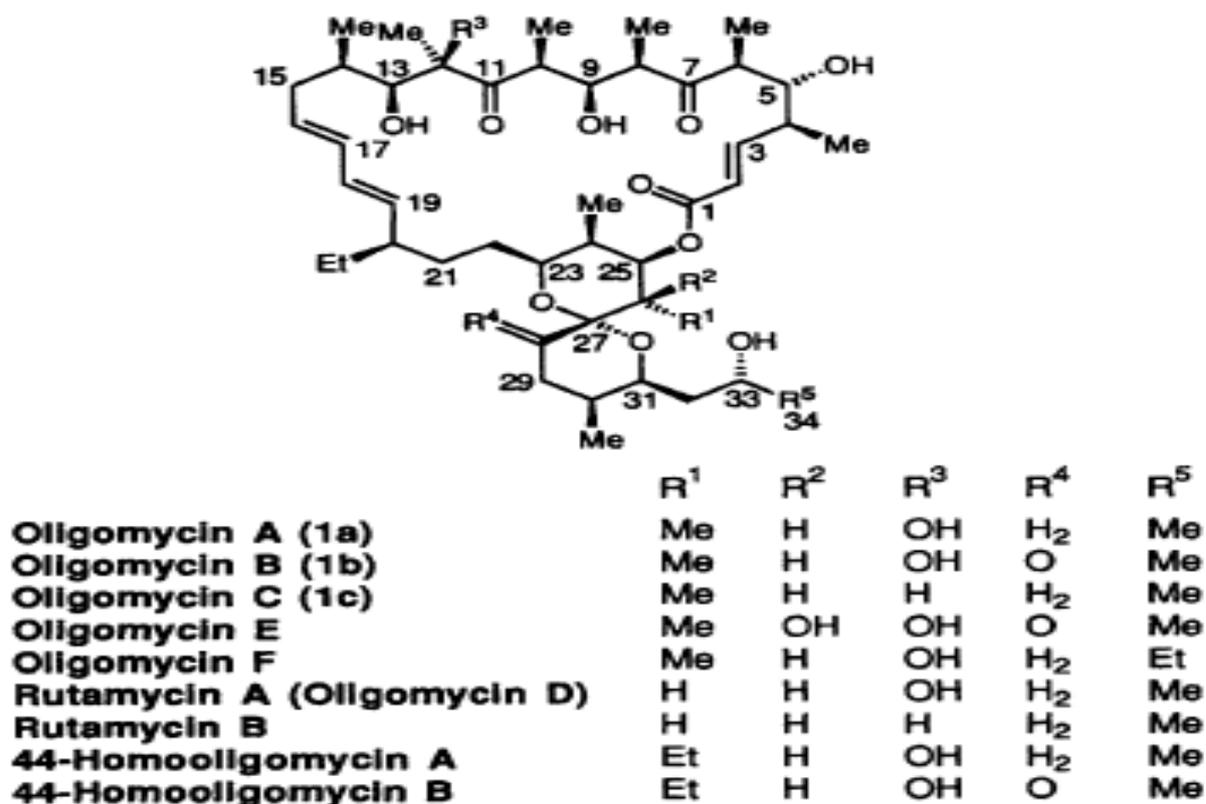


Рисунок 1.2. Химическая структура семейства олигомицинов (А, В, С, Е, F, D, рутамицин А, В и 44-гомоолигомицин А,В) [Nakata et al., 1995].

1.4. *Streptomyces fradiae* как продуцент макролидного антибиотика тилозина

Большинство коммерческих антибиотиков нарабатываются в производстве актинобактериями семейства стрептомицетов путем культивирования (прямой ферментации) [Riley et al., 2000]. Штаммом-продуцентом тилозина, используемого в ветеринарии, является *Streptomyces fradiae* TM-224 (коммерческое название штамма - *Streptomyces fradiae* C373.17) [Baltz, 2016; Choi et al., 2007]. Тилозин обладает широким спектром активности против грамположительных микроорганизмов и ограниченным диапазоном действия против грамотрицательных микроорганизмов [Giguère, 2006]. Для изучения генов, отвечающих за синтез тилозина, использовали геном штамма *S. fradiae* ATCC 19609 [Baltz, 2016]. Тилозиновый кластер состоит из 43 генов, что составляет менее 1% в геноме *S. fradiae* [Cundliffe, 1999]. В этот кластер входят как минимум 3 гена, отвечающих за формирование устойчивости, и по меньшей мере 5 регуляторных генов (*tylQ*, *tylP*, *tylS*, *tylR* и *tylT*). Среди этих регуляторных генов, *tylP* является основным регуляторным геном, отвечающим за продукцию тилозина, а также за процессы морфологической дифференциации [Folcher et al., 2001]. Для увеличения продукции тилозина используются различные методы, в том числе и мутагенез. Последние работы в этой области позволили увеличить продукцию тилозина в 6.87 раз благодаря УФ мутагенезу [Khaliq et al., 2014]. Было показано, что мутации в генах *tylQ*, *tylP* приводят к увеличению продукции тилозина. В работе Люцкановой и др. был использован УФ мутагенез и мутагенез нитрозогуанидином. Были получены варианты, выход тилозина которых превышал продукцию исходного штамма-продуцента на 0.5-28.3%. Наиболее активные варианты произведены с помощью комбинированного воздействия УФ и нитрозогуанидина. УФ-излучением обрабатывали протопласты, которые впоследствии высевали на нитрозогуанидин [Liutskanova et al., 2005]. Вторичные метаболиты часто являются конечным результатом сложного биосинтетического процесса.

Мутантные штаммы, полученные в процессе улучшения штаммов - продуцентов вторичных метаболитов, подвергаются скринингу и селекции для выбора наилучших по своим характеристикам для дальнейшего процесса промышленной ферментации [Bos et al., 1996; Elander, 1967]. Поэтому, идентификация мутации в геноме штамма-продуцента является необходимой для понимания механизма увеличения продукции тилозина.

Глава 2. Механизмы устойчивости к макролидным антибиотикам

2.1. Механизмы возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам

После первого широкого применения антибактериальных препаратов в 1940х годах, бактериальные патогены начали приобретать устойчивость к существующим лекарственным средствам, особенно в процессе чрезмерного использования антибиотиков. Сейчас можно выделить три основных механизма бактериальной устойчивости к антибиотикам:

1. Наличие фермента, который инактивирует антибиотик (к примеру, β -лактамаза, которая гидролизует β -лактамовое кольцо пенициллинов)
2. Мутация в сайте-мишени рецептора, фермента или субъединицы рибосомы, что приводит к невозможности связывания антибиотика и его мишени
3. Модификация или сверхэкспрессия транспортных белков, что приводит либо к непопаданию антибиотика внутрь клетки, либо его выбросу из клетки [Tenover, 2006].

Эти механизмы были обнаружены в штаммах, продуцирующих макролидные антибиотики, при этом в клетке часто одновременно работает несколько механизмов, для защиты от антимикробного действия антибиотиков, которые они производят. При лечении заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами, макролидными антибиотиками важно учитывать уровень чувствительности микроорганизмов к этим антибиотикам. В особенности соотношение активности веществ к их токсичности по отношению человека. Лечение одним препаратом, особенно при несоблюдении сроков лечения, могут вызвать возникновение лекарственно устойчивых форм у патогенных микроорганизмов, поэтому необходим комплексный подход к лечению заболеваний, вызванных ими. К примеру, модификация рибосомной мишени приводит к возникновению устойчивости к широкому ряду антибиотиков, для которых она является мишенью, а такие антибиотики могут относиться к разным

химическим классам, в то время как выброс антибиотика из клетки и его инактивация могут приводить к устойчивости только к одному антибиотику (или к структурно похожим антибиотикам), так как влияет только на саму его молекулу.

Таким образом, существует острая необходимость изучения создания новых стратегий для обнаружения и разработки эффективных антибиотиков для преодоления широко распространенной и растущей устойчивости к антибиотикам. Одна из возможных стратегий заключается в поиске принципиально новых бактериальных белков, которые могут стать мишенями для новых классов антибиотиков. В особенности представляет интерес разработка антибиотиков, которые действовали бы не на одну биомшень в клетке, а на несколько одновременно. (Рисунок 2.1.)

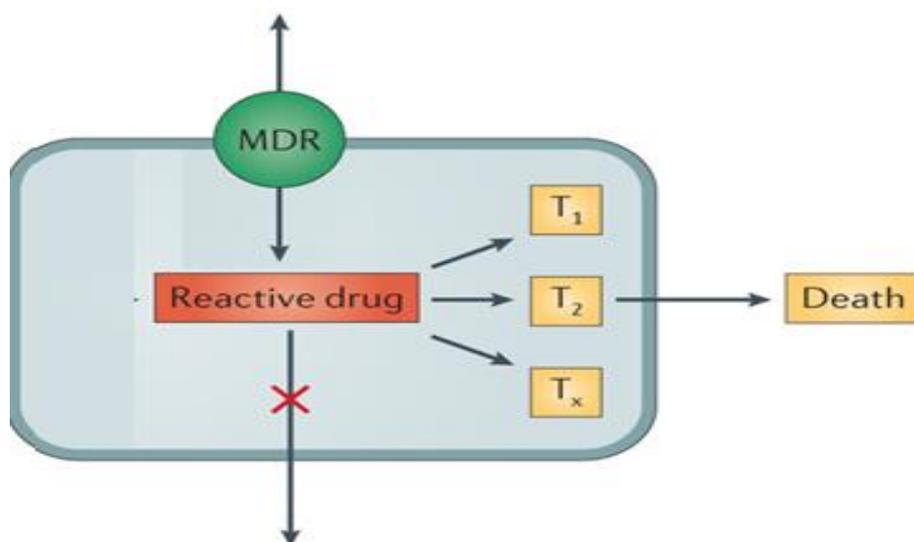


Рисунок 2.1. Предполагаемый механизм действия новых разрабатываемых антибиотиков в клетке. С модификациями [Lewis, 2013].

Антибиотик ковалентно присоединяется к нескольким несвязанным между собой мишеням (T_1, T_2, \dots, T_x), убивая и активно делящиеся и покоящиеся клетки, тем самым стерилизуя инфекцию. Ковалентная связь с биомишенями обеспечивает необратимое связывание, что приводит к эффективному накоплению в клетке активного лекарственного средства в течение определенного

времени и обеспечение специфично широкого действия. При этом антибиотик не должен быть инактивирован существующими в клетке системами MDR.

2.2. Метилирование рибосомального сайта связывания антибиотика

В 1956 году, вскоре после введения макролидного антибиотика эритромицина в лекарственную терапию были обнаружены штаммы стафилококков с возникшей резистентностью. Биохимические исследования показали, что резистентность возникала в результате метилирования рибосомной мишени антибиотиков, что приводило к перекрёстной устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограминам В, такой фенотип был обозначен MLS_B . [Weisblum, 1995]. Впоследствии было выявлено, что возникновение фенотипа MLS_B обусловлено различными генами *erm* (erythromycin ribosome methylase), которые широко представлены в геномах различных микроорганизмов [Roberts et al., 1999]. До сих пор метилирование рибосом остается наиболее распространенным механизмом устойчивости к макролидам и линкозамидам. У патогенных бактерий, ERM белки диметилируют аденин в зарождающихся 23S рРНК, которая является частью большой (50S) рибосомальной субъединицы [Weisblum, 1995]. Остаток A2058 находится в пределах консервативной области домена V 23S рибосомальной РНК, который играет ключевую роль в связывании MLS_B антибиотиков. При метилировании, связывание эритромицина с его мишенью нарушается. Одинаковые сайты связывания для макролидов, линкозамидов и стрептограминов В в 23S рРНК приводят к возникновению перекрестной устойчивости к трем классам лекарственных средств. Широкий спектр микроорганизмов, на которые действуют макролиды и линкозамиды, в том числе грамположительные кокки (стрептококки, стафилококки) и внутриклеточные и мембранные паразиты (микоплазмы, хламидии, кампилобактерии и легионеллы), экспрессируют ERM метилазы.

2.3. Возникновение мутации в сайте связывания

Помимо модификации биомишени антибиотика существует механизм возникновения устойчивости при котором происходит мутация в сайте связывания антибиотика. Изучение *in vitro* мутантов *E.coli*, устойчивых к эритромицину позволило охарактеризовать участок связывания данного антибиотика с рибосомой. Возникновение мутаций, которые приводят к замене аминокислотных остатков A2058 или A2059 в области V рРНК, приводят к возникновению MLS_B и ML устойчивости соответственно [Vester et al., 2001]. В зависимости от вида, бактерии обладают от одного до нескольких *rrn* оперонов, кодирующих 23S рРНК. Возникновение подобной мутации приводит к устойчивости таких штаммов, как *Mycobacterium avium*, *Helicobacter pylori* [Vester et al., 2001], *Treponema pallidum*, *Propionibacterium sp.*, *S. pneumonia* и другие. [Tait-Kamradt et al., 2000].

2.4. Выброс антибиотика из клетки

Не менее важным механизмом возникновения устойчивости является выброс антибиотиков из клетки. В геномах грамотрицательных бактерий кодируются белки транспортеры, которые способствуют возникновению устойчивости к гидрофобным соединениям, таким как макролидные антибиотики. Эти белки транспортеры часто состоят из 12 трансмембранных регионов. У грамположительных микроорганизмов, механизмы устойчивости к макролидным антибиотикам обусловлены активным транспортом, который происходит благодаря двум классам транспортеров – семейство (ABC) транспортеров (ATP-binding-cassette (ABC) transporter superfamily) и семейство MFS транспортеров (major facilitator superfamily). В процессе изучения генов, отвечающих за возникновение устойчивости у стрептомицетов, которые продуцируют антибиотики, было выявлено, что многие из них кодируют ABC-транспортеры [Li et al., 2014; Marshall et al., 1997; Ostash et al., 2012; Takano et al., 2016]. Механизм

работы АТФ-зависимых АВС транспортеров заключается в выбросе антибиотиков и ксенобиотиков из клетки, что приводит к детоксификации или возникновению устойчивости к различным группам химических соединений (Рисунок 2.2.).

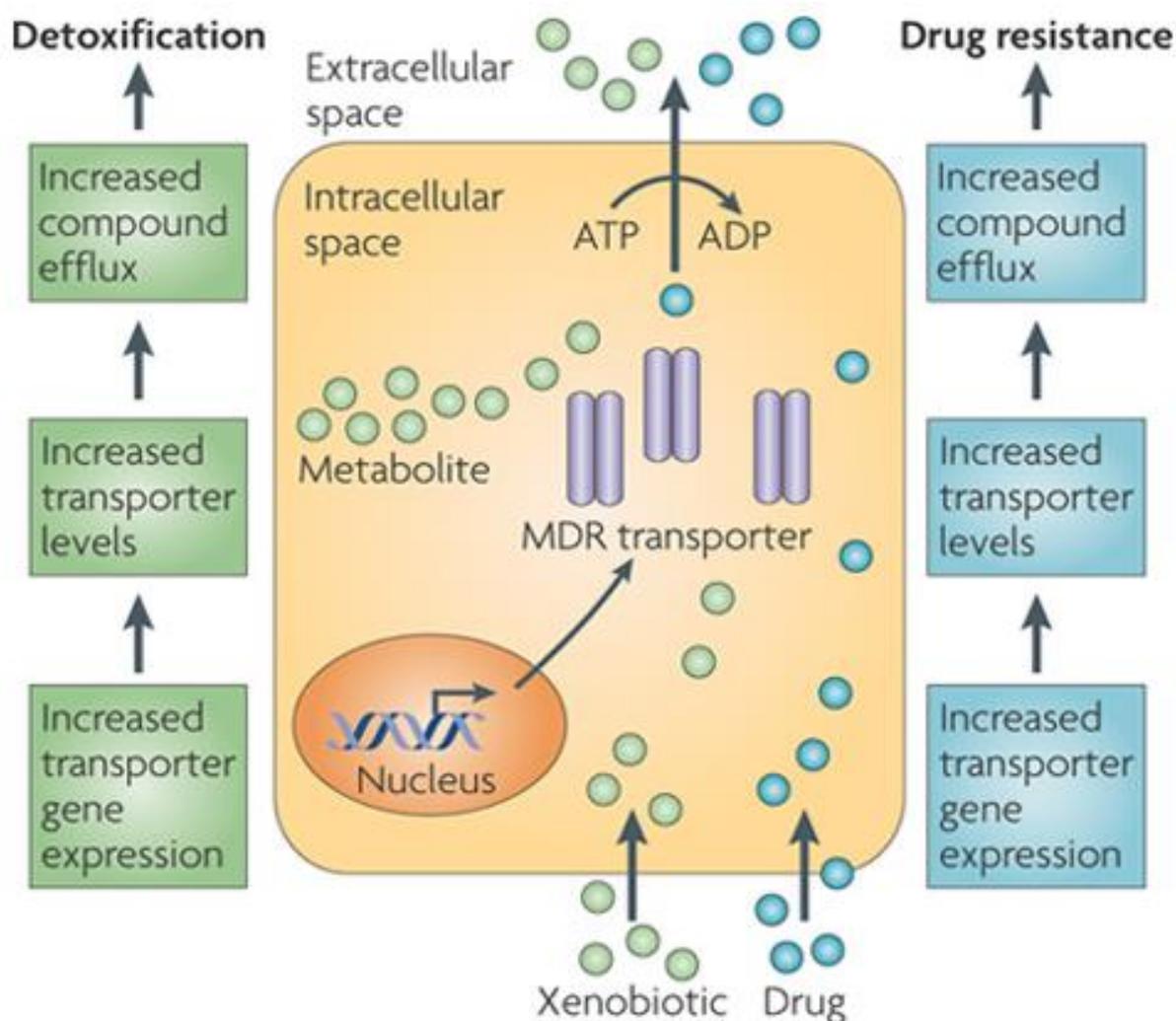


Рисунок 2.2. Схема механизма работы АВС-транспортеров в клетке, которые обуславливают возникновение устойчивости к антибиотикам различных классов. [Fletcher et al., 2010]

Обычно АВС-транспортеры состоят из двух компонентов – гидрофильная и гидрофобная. Гидрофильная область (обозначается как АТФ-binding component) - нуклеотид-связывающий домен, обычно состоит из 200 аминокислот, которые как предполагается отвечают за АТФ-связывание и гидролиз. Эта область имеет два характерных мотива, известных как Walker А и В [Walker et al., 1982]. Эти мотивы

являются высококонсервативными в геномах актиномицетов и присутствуют у всех актиномицетов, продуцирующих антибиотики. Различные транспортеры могут содержать один или два нуклеотид-связывающих домена.

Гидрофобный компонент ABC транспортера непосредственно взаимодействует с цитоплазматической мембраной. Оба компонента либо могут кодироваться с помощью двух независимых генов или могут быть слиты в одном гене. ABC транспортеры в антибиотик-продуцирующих штаммах актиномицетов могут быть разделены по трем типам в зависимости от количества и организации нуклеотид-связывающих доменов (Рисунок 2.3.).

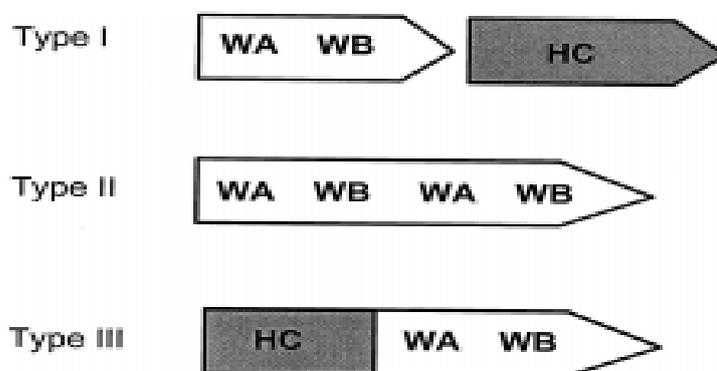


Рисунок 2.3. Структура генов и их организация в различных ABC транспортерах у актиномицетов, продуцирующих антибиотики. WA и WB представляют так называемые Walker A и B мотивы АТФ связывающего домена. HC - гидрофобный компонент транспортера [Méndez et al., 1998].

Тип I содержит систему из двух генов: один ген, кодирующий гидрофильный полипептид, содержащий единственный нуклеотид-связывающий домен, и второй ген, кодирующий гидрофобный мембранный белок. Транспортеры антибиотиков даунорубицина [Guilfoile et al., 1991], тетраоназина [Linton et al., 1994], митрамицина [Fernández et al., 1996], и один из двух транспортеров олеандомицина [Rodríguez et al., 1993] принадлежат к этой группе.

Вторая группа, тип II, включает в себя транспортеры антибиотиков, которые состоят только из гена, кодирующего гидрофильный полипептид с двумя нуклеотид-связывающими доменами. Этот тип транспортеров обычно участвует в переносе макролидных антибиотиков: карбомицин и спирамицин [Schoner et al., 1992], тилозин [Rosteck et al., 1991] и второй транспортер олеандомицина [Olano et al., 1995]. Также II тип транспортера был описан для продуцента аминоксилнуклеозидного антибиотика (A201A) *Streptomyces capreolus*-NRRL3817 [Barrasa et al., 1995]. Третья группа представлена только транспортерами блеомицина [Calcutt et al., 1994] и стрептомицина [Takano et al., 2016]. В них содержатся обе области (гидрофильная и гидрофобная) как у представителей I типа, но они слиты в один полипептид. Транспортер, который участвует в переносе стрептомицина, вероятно кодируется двумя генами с аналогичной структурой (*strV* и *strW*), но у *strV* отсутствует Walker A мотив.

Описано, что при клонировании генов большинства ABC транспортеров, которые вовлечены в транспорт антибиотиков, из штаммов продуцентов в чувствительные штаммы, у последних возникает устойчивость. Тем не менее не всегда существуют прямые экспериментально полученные доказательства вовлеченности транспортеров в механизм устойчивости. [Calcutt et al., 1994; Thamm et al., 2006]

Для транспортеров I типа наличие мембранного компонента белка обязательно, исключение составляет только транспортер олеандомицина (OleC) [Rodríguez et al., 1993]. Для транспортеров II типа, у которых отсутствует мембранный белок и соответствующие гены, необходимо наличие генов в геноме хозяина, которые будут кодировать АТФ-связывающий белок. Возникновение устойчивости, обусловленной транспортером тилозина (TlrC) зависит от организма хозяина – так у *Streptomyces lividans* устойчивость не возникает, тогда как у тилозин-чувствительного штамма *Streptomyces fradiae* устойчивость появляется [Rosteck et al., 1991]. В случае с транспортером карбомицина (CarA) у *Streptomyces thermotolerans* было показано, что необходима дополнительная

нуклеотидная последовательность для возникновения устойчивости к карбомицину [Schoner et al., 1992]. На сегодняшний день единственными открытыми транспортерами, которые отвечают за возникновение механизма устойчивости к макролидным антибиотикам, являются белки, кодируемые генами *msr(A)* у штамма *Staphylococcus* [Peschke et al., 1995]. Данный ген кодирует ABC транспортер с двумя АТФ-связывающими доменами. Предполагается, что механизм транспорта 14- и 15-членных макролидных антибиотиков и стрептограминов типа В осуществляется многокомпонентной системой, в которую включены *msr* и другие гены, но трансмембранный компонент транспортера MsrA пока остается неизвестным. Существуют также другие транспортеры, которые могут быть вовлечены в процесс возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам. Так для олигомицина было показано, что мембранный ABC транспортер Yor1p вовлечен в процесс формирования устойчивости у *Saccharomyces cerevisiae* [Grigoras et al., 2008]. Таким образом, механизм возникновения устойчивости вследствие транспорта антибиотиков из клетки является многокомпонентным и в него могут быть вовлечены различные гены.

2.5. Модификация антибиотиков в клетке

Еще одним механизмом возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам у бактерий является их модификация в клетке, что приводит к невозможности их связывания с биомишенью. В отличие от других механизмов в данном случае возникает устойчивость только к структурно похожим антибиотикам. Было показано, что эстеразы [Arthur et al., 1986; Ounissi et al., 1985] и фосфотрансферазы [Kono et al., 1992; O'Hara et al., 1989] могут способствовать возникновению устойчивости к эритромицину и другим 14 и 15-членным макролидным антибиотикам. Основной фосфотрансферазой, которая инактивирует эритромицин является Mph(A) (macrolide 2'-phosphotransferase I).

Было показано, что данная фосфотрансфераза способна к негативной саморегуляции в присутствии эритромицина [Noguchi et al., 2000].

По литературным данным существует большое количество механизмов, вовлеченных в процесс возникновения устойчивости к антибиотикам у актинобактерий. Для изучения механизмов устойчивости к макролидному антибиотику олигомицинуА и его производным разработана тест-система на основе штамма *S. fradiae* ATCC 19609, который является сверхчувствительным к олигомицину А.

2.6. Устойчивость к макролидным антибиотикам *S. fradiae*, обусловленная способностью продуцировать тилозин

Тилозин-продуцирующий штамм *S. fradiae* содержит по меньшей мере четыре гена (*tlrA*, *tlrB*, *tlrC*, *tlrD*) ответственных за возникновение устойчивости к тилозину. Ген *tlrA*, *tlrB* и *tlrD* кодируют метилтрансферазы, которые метилируют 23S рРНК [Kelemen et al., 1994]. Введение гена *tlrA* в *S. lividans* приводит к возникновению устойчивости штамма к тилозину [Liu et al., 2000]. TlrB добавляет одну метильную группу к нуклеотиду G748 в 35 спирали 23S рРНК. После того как функция гена *tlrB* была определена, было показано, что гены-ортологи присутствуют у бактерий различных родов [Vujnicki et al., 2002; Liu et al., 2002]. Наличие гомологичных генов в геномах стрептомицетов привело к искажению интерпретации данных о механизме возникновения устойчивости к тилозину. Было показано, что в геноме *S. lividans* присутствует ген гомологичный *tlrD*. Инактивации в *S. lividans* гена, гомологичного *tlrD* и последующее введение гена *tlrB* не восстанавливает фенотип устойчивости. Только введение обоих генов – *tlrB* и *tlrD* в лабораторный штамм *S. lividans tlrD*⁻ приводит к возникновению устойчивости. Эти результаты были последовательно продублированы в тилозин-чувствительном штамме *E.coli*. Кроме того, грамположительные бактерии *Corynebacterium glutamicum*, которая не обладает собственным геном *tlrB*, но имеет более высокий уровень устойчивости к тилозину по сравнению с *S. lividans*

становятся полностью устойчивыми после введения в геном гена *tlrD*. Таким образом, для возникновения устойчивости необходимо метилирование в двух разных местах рРНК одновременно (G748 и A2058 [Liu et al., 2002]).

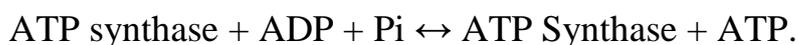
Аминокислотная последовательность белка TlrC имеет высокий процент идентичности с различными эукариотическими и прокариотическими мембранными белками активного транспорта. Эти результаты указывают на роль продукта гена *tlrC* как составляющую АТФ-зависимой транспортной системы для активного выведения тилозина из продуцирующего тилозин организма. Таким образом, устойчивость *S. fradiae* к тилозину обеспечена сразу несколькими механизмами, а именно – активным транспортом антибиотика из клетки и метилирования двух рибосомальных сайтов связывания антибиотика.

Глава 3. Известные механизмы действия олигомицина А на эукариотческие и бактериальные клетки

Помимо перечисленных в главе 2 механизмов действия антибиотиков существуют и другие. К примеру антибиотик олигомицин, относящийся к классу макролидных антибиотиков [Smith et al., 1954] ингибирует активность АТФ-синтазы в плазматических мембранах бактерий, в тилакоидных мембранах хлоропластов растений и во внутренних мембранах митохондрий эукариот путем блокировки протонного канала (F₀-субъединицы), который необходим для процесса окислительного фосфорилирования АДФ в АТФ, что приводит к гибели клетки.

3.1. АТФ-синтаза – биомишень действия олигомицина А у эукариот

АТФ-синтаза является основным комплексом производства клеточной энергии у всех животных, растений, и почти во всех микроорганизмах. Аденозинтрифосфат (АТФ), универсальный источник энергии, который синтезируется АТФ-синтазой путем окисления или фосфорилирования в мембранах бактерий, митохондрий и хлоропластах. Общая последовательность реакции можно записать следующим образом:



Синтез АТФ требует наличия механизма механического поворота, в котором субъединицы АТФ-синтазы вращаются со скоростью примерно 100 раз в секунду, чтобы синтезировать энергию путем окисления. АТФ-синтаза (ЕС 3.6.3.14) представляет собой общий термин для фермента, который может синтезировать аденозинтрифосфат (АТФ) из АДФ и неорганического фосфата. АТФ-синтаза является одним из самых маленьких биологических наномоторов, найденных в живых организмах. Среднестатистический человек при нормальной жизни к 75 годам ориентировочно может сгенерировать около 2,0 млн кг АТФ из

АДФ и P_i (неорганический фосфат), а ежедневное приблизительное количество используемой человеком АТФ в день может достигать 40 кг. Можно предположить, что каждая молекула АДФ в организме должна фосфорилироваться, а АТФ дефосфорилироваться в среднем 1000 раз в день. [Ahmad et al., 2010; Ahmad et al., 2011; Senior et al., 2002]. Структурная и функциональная активность фермента АТФ-синтазы по существу одинакова у всех прокариот и эукариот [Boyer, 1997; Dibrova et al., 2010; García et al., 2000; Kabaleeswaran et al., 2006; Kabaleeswaran et al., 2009].

Общее число протонов, необходимых для синтеза одной молекулы АТФ у различных организмов варьируется от трех до четырех, при этом в клетке это количество может изменяться в зависимости от физиологических потребностей [Schemidt et al., 1998; Walraven Van et al., 1996; Yoshida et al., 2001]

АТФ-синтаза является одним из наиболее консервативных ферментов. Следовательно, АТФ-синтазы из внутренней мембраны митохондрий и тилакоидной мембраны хлоропластов имеют идентичные структурные и функциональные свойства относительно АТФ синтазы бактерий, таким образом существует высокое сходство между эукариотической и бактериальной АТФ-синтазой [Kucharczyk et al., 2009].

3.2. Классификация различных АТФ-синтаз

Прежде чем обсуждать детальную структуру FoF1 АТФ-синтазы, было бы целесообразно кратко описать другие типы АТФаз. АТФ-синтазы F-типа (названные так в честь «phosphorylation Factor», а также известные как FoF1-АТФазы и H^+ -transporting ATPases) являются чрезвычайно консервативными белками среди организмов и являются основными ферментами, осуществляющими синтез АТФ в живых системах. Данный фермент расположен в плазматических мембранах бактерий, в тилакоидных мембранах хлоропластов и

во внутренних мембранах митохондрий. У некоторых бактерий также присутствуют Na^+ -transporting F-АТФ-синтазы.

АТФ-синтазы V-типа (названные в честь «Vacuole») встречаются в эукариотических эндомембранных системах, например, в вакуолях, в аппарате Гольджи, эндосоме, лизосоме, в плазматической мембране прокариот и некоторых специализированных эукариотических клеток. V-АТФазы способны гидролизовать АТФ для работы протонного насоса, но не способны работать в обратном направлении-для синтеза АТФ [Gogarten et al., 1992; Nelson et al., 2000] встречаются только у архей и имеют аналогичную функцию с F-АТФазами. АТФазы А-типа возможно возникли как адаптация к различным потребностям клетки в более экстремальных условиях окружающей среды, с которыми сталкиваются виды архей.

АТФ синтазы Р-типа (Р-АТФазы, также известные как E1-E2 АТФ синтазы) встречаются у бактерий и в ряде плазматических мембран и органелл эукариот. Функция Р-АТФазы заключается в транспорте различных соединений, в том числе ионов и фосфолипидов, через мембрану, используя в качестве энергии гидролиз АТФ. Есть много различных классов Р-АТФаз, каждый из которых вовлечен в транспорт конкретных типов ионов: H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ и Ag^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^+ и Cu^{2+} .

АТФ-синтазы E-типа (названные так в честь «Extracellular») являются ферментами, связанными с мембранами клеточной поверхности и обладают широкой субстратной специфичностью. Их функция состоит в гидролизе других нуклеозидтрифосфатов, кроме АТФ, а также внеклеточного АТФ [Müller et al., 1999; Toyoshima et al., 2000; Wilms et al., 1996].

3.3. FoF1-АТФ-синтаза

FoF1-АТФ-синтаза имеет продолжительную историю исследований. Частица F1 была впервые выделена Racker в 1961 году. Частица Fo получила свое название

вследствие ее ингибирования олигомицином в мембранной АТФ-синтазе. Наиболее простое строение FoF1-АТФ-синтазы у *E. coli*. У прокариот она содержит восемь типов различных субъединиц (у млекопитающих количество субъединиц варьируется от 16 до 18), а именно $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10}$. Общая молекулярная масса составляет ~ 530 кДа (варьируется от 550 до 650 кДа). F1 содержит субъединицы $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, а Fo - субъединицы ab_2c_{10} в стехиометрии 1:2:10-14. (Рисунок 3.1.).

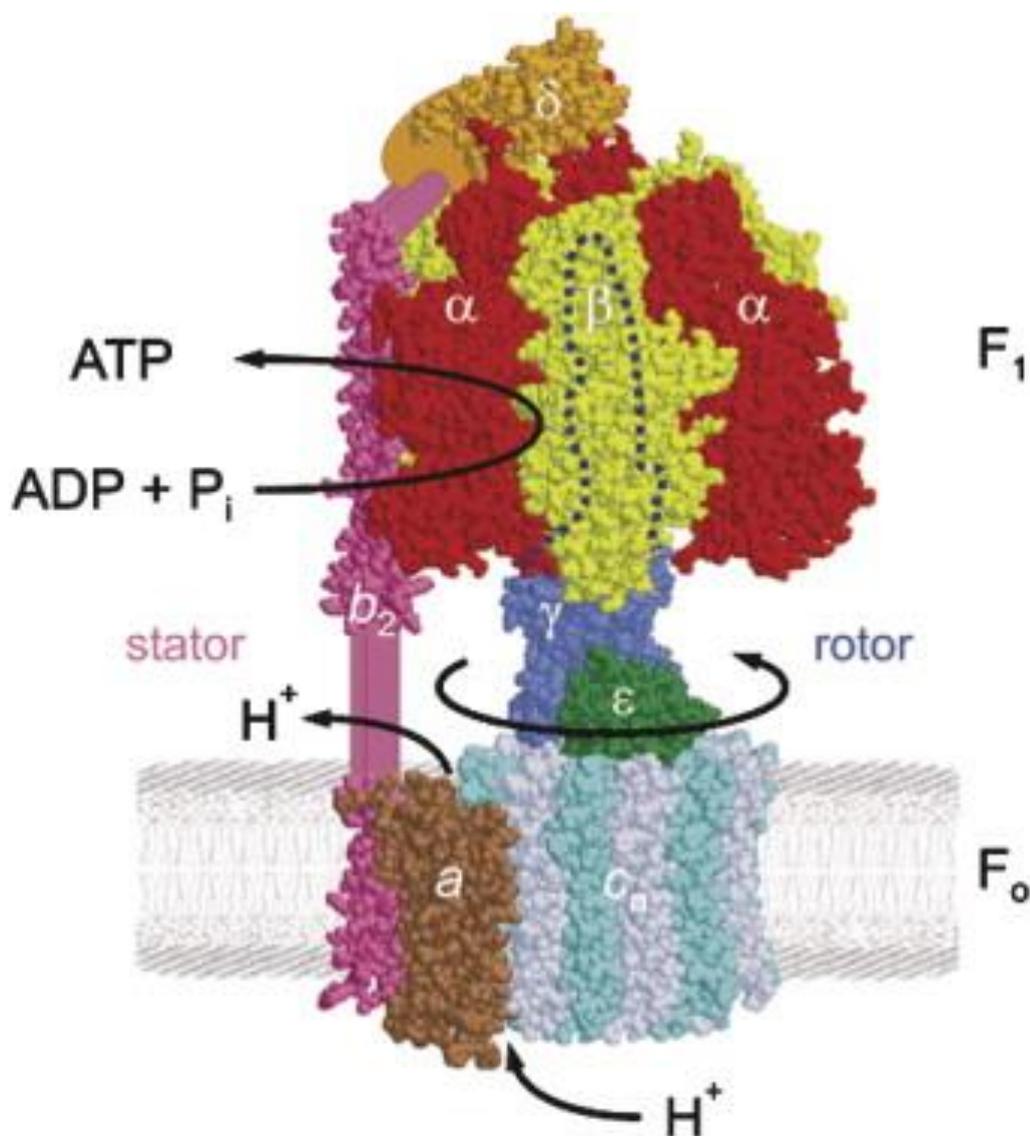


Рисунок 3.1. Схематическое представление FoF1-АТФ-синтазы [Gao et al., 2005].

У млекопитающих дополнительные субъединицы расположены в основном в области F1. При этом по литературным данным FoF1-АТФ-синтаза дрожжей

является самым сложноорганизованным ферментом и состоит из 20 типов различных субъединиц [Kabaleeswaran et al., 2009]. У растений АТФ-синтаза находится в хлоропластах (CFoF1-АТФ-синтаза). Фермент встроен в тилакоидную мембрану; CF1 часть встроенна в строму и является неотъемлемой структурой при ночных реакциях фотосинтеза (цикл Кальвина) и синтеза АТФ. В хлоропластах структура FoF1-АТФ-синтазы идентична, за исключением того, что есть две изоформы. В митохондриях присутствуют 7-9 дополнительных субъединиц в зависимости от вида, но они обладают слишком малой массой относительно всего фермента и имеют регуляторные функции [Devenish et al., 2000; Karrasch et al., 1999; Senior, 1988]. Синтез и гидролиз АТФ происходит на трех каталитических сайтах в F1 секторе, в то время как перенос протона происходит через встроенный в мембрану Fo сектор. γ -субъединица образует спиральную катушку, состоящую из альфа-спиралей, которая находится в центральном пространстве $\alpha\beta\gamma$ шестиугольника. Протонный градиент запускает вращение по часовой стрелке (если смотреть с наружной мембраны) γ -субъединицы, что приводит к синтезу АТФ, а вращение против часовой стрелки γ -субъединицы приводит к гидролизу АТФ. При каждом обороте γ -субъединицы на 360° синтезируются три молекулы АТФ.

3.4. Механизм синтеза и гидролиза АТФ

Когда молекула АТФ связывается с одним каталитическим участком – взаимодействие является высокостабильным, но тогда АТФ гидролиз происходит очень медленно. Появление избытка АТФ приводит к связыванию во всех трех каталитических центрах, но с гораздо более низкой аффинностью субстрата на втором и третьем каталитических центрах. K_d для связывания АТФ на первом каталитическом центре составляет <1 нМ, тогда как на втором и третьем каталитическом центре составляет ~ 1 мкМ и 30 мкМ, соответственно. При связывании третьего каталитического центра с АТФ, интенсивность гидролиза АТФ увеличивается в 10^4 - 10^5 раз. [Weber et al., 2000]. Таким образом, F1 сектор

состоит из трех α и трех β субъединиц (последовательно расположенные субъединицы α и β образуют структуру, характеризующуюся осью симметрии третьего порядка с углом поворота 120°), которые показывают строгую отрицательную кооперативность связывания субстрата и, в то же время, строгую положительную кооперативность ферментативной активности. В литературных данных это называется гипотеза изменения участка связывания [Boyer, 1993]. Ключевой особенностью этой гипотезы является то, что три каталитических сайта (три пары $\alpha\beta$ субъединиц, которые содержат эти сайты) находятся каждый в разной конформации в любой момент времени. Один из них открыт и готов к связыванию АТФ (или $ADP + P_i$), в то время как второй и третий являются частично открытыми и закрытыми, соответственно. Связывание АТФ, в результате чего сайт становится закрытым, создает конформационные изменения, при которых остальные два сайта изменяются таким образом, что закрытый сайт становится частично открытым, а частично открытый становится полностью открытым. Таким образом, каждый сайт переключается между тремя состояниями как при гидролизе АТФ, так и при синтезе АТФ, но в другом направлении. (Рисунок 3.2.)

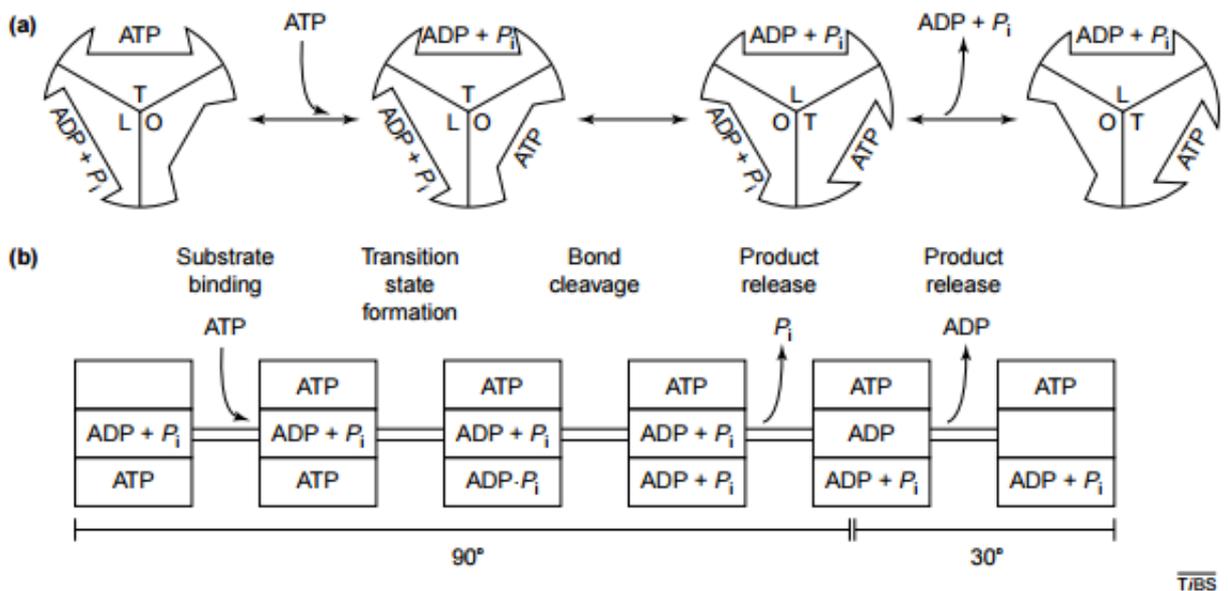


Рисунок 3.2. Гипотеза изменения участка связывания и вращение каталитического сайта связывание γ субъединицей [Capaldi et al., 2002].

Каждый каталитический сайт проходит во время цикла через три состояния: T, L и O. АТФ связывается с O сайтом (открытый и пустой), чтобы превратить его в T сайт (связанный с АТФ). После разрыва связи, сайт T превращается в L сайт (связанный с АДФ + Pi), в то время как АДФ+Pi разрывается с O сайтом. В любое время, каждый из трех каталитических сайтов находится в состоянии O, T и L соответственно. Переключение этих состояний в каждом из участков приводит к гидролизу (или синтезу) одной молекулы АТФ и вращению γ -ротора на 120° . Этапы гидролиза или синтеза одной молекулы АТФ на трех сайтах связывания представлены на Рисунке 3.2 [Capaldi et al., 2002]. По имеющимся литературным данным ротор состоит из γ сn субъединиц, а статор состоит из $\alpha_3\beta_3\delta\alpha\beta_2$ субъединиц [Diez et al., 2004; Itoh et al., 2004; Weber, 2006]. Функция статора заключается в предотвращение совместного вращения каталитических центров и ротора.

В общей сложности на F1 секторе АТФ-синтазы существует шесть нуклеотидных участков связывания. Три каталитических участка в основном предоставлены в β -субъединицы, а три некаталитических участка связывания в основном представлены в λ -субъединице. Три каталитических участка связывания обозначаются как β TP, PDP и β E, и они были обнаружены методом рентгеновской кристаллографии на основе связывания АТФ, АДФ и Pi соответственно [Leslie et al., 2000; Menz et al., 2001]. Pi первоначально связывается с β E (пустой сайт) для синтеза АТФ. Реакция синтеза происходит в трех каталитических центрах взаимозависимо и последовательно. Каждый каталитический сайт претерпевает конформационные изменения, что приводит к возникновению следующей реакции: субстрат (АДФ + Pi) связывание \rightarrow синтез АТФ \rightarrow выделение АТФ. В секторе F0 происходит механическое вращение вала ротора, которое приводит к конформационным изменениям каталитических доменов в F1 для синтеза АТФ. Обратная реакция гидролиза АТФ вызывает обратные конформационные изменения сектора F0 и, следовательно, меняет направление вращения вала ротора. Эти конформационные изменения в каталитических центрах связаны с

вращением γ -субъединицы. Более глубокое понимание структуры и функции комплекса FoF1 могло бы осветить возможные пути развития АТФ-синтазы в качестве мишени молекулярного лекарственного средства и его применения в области нанотехнологий и наномедицины [Khataee et al., 2009; Whitesides, 2003]

Следовательно, понимание структуры и каталитической функции АТФ-синтазы, в частности, каким образом связывание P_i приводит к образованию АТФ, имеет первостепенное значение для понимания процессов ингибирования работы фермента при связывании его с лекарственными средствами. [Bullough et al., 1989; Gledhill et al., 2005; Hong et al., 2008]

3.5. АТФ-синтаза как перспективная биомишень

На важность АТФ-синтазы в качестве перспективной биомишени при разработке лекарственных средств также указывает тот факт, что многие антибиотики, такие как ефрапептин, ауровертин и олигомицин ингибируют именно АТФ – синтазу. Ефрапептин и ауровертин ингибируют синтез и гидролиз АТФ. [Abrahams et al., 1996; Raaij van et al., 1996]. Олигомицин является мощным ингибитором АТФ-синтазы путем связывания с комплексом Fo, что приводит к блокировке протонной проводимости. По литературным данным было показано, что олигомицин индуцирует апоптотический ответ в культивированных лимфобластоидных клеток человека и других клетках млекопитающих в течение 12-18 часов, но при этом митохондриальные ингибиторы не вызывают апоптоз в клетках, в которых отсутствует митохондриальная дыхательная цепь [Wolvetang et al., 1994]. Другое подобное исследование показало, что олигомицин взаимодействует с отдельными компонентами митохондрий, что в свою очередь может привести к апоптозу отдельных клеток из-за увеличения экспрессии CD 14 [Mills et al., 1999]. Таким образом, вполне возможно, что взаимодействия между АТФ-синтазой и другими ингибиторами, могут играть значительную роль в механизмах апоптоза в митохондриях. Известно, что связывание олигомицина А происходит только с определенными аминокислотами в c - субъединице.

3.6. Механизм связывания олигомицина А и С-субъединицы FoF1-АТФ-синтазы.

Из-за широкого использования ингибиторов подобных олигомицину и существующего потенциала для обнаружения новых лекарственных средств на основе данного механизма (ингибирование С-субъединицы FoF1-АТФ-синтазы) – изучение олигомицин-связывающего сайта представляет большой интерес.

С субъединица АТФ-синтазы является интегрированным в мембрану белком, состоящим из двух спиралей, 1 и 2, которые проникают во внутреннюю митохондриальную мембрану (Рисунок 3.1.). С-субъединица представляет из себя кольцо, состоящее из различного количества субъединиц в зависимости от вида. К примеру, у АТФ синтазы дрожжей этот комплекс состоит из 10 субъединиц, а у АТФ-синтазы коров - из 8 субъединиц [Stock et al., 1999; Watt et al., 2010].

С-субъединица является существенным компонентом протонной турбины АТФ-синтазы, который преобразовывает электрохимическую энергию в механическое вращение, и наоборот. Неотъемлемой частью С - субъединицы является глутаминовая кислота (Glu59) в спирали 2, функция которой заключается в непосредственном движении протонов из цитозоля в митохондриальный матрикс во время синтеза АТФ. Боковая цепь карбоксильной группы Glu59 находится почти в середине спирали 2, располагаясь в липидном двойном слое. Она участвует в протонировании, обладая закрытой конформацией. Субъединица А формирует два протонных полуканала, с помощью которых протон переносится и связывается с карбоксильной группой Glu59 в открытой конформации, что делает возможным процесс протонирования и депротонирования. [Fillingame et al., 2014; Pogoryelov et al., 2010]. Олигомицин А связывается с двумя соседними субъединицами С-кольца, которое расположено на протонном канале, и блокирует основные карбоксильные группы, что приводит к ингибированию транслокации протонов. Молекула олигомицина А связывается с аминокислотным остатком Glu59 и препятствует связыванию боковой цепи карбоксильной группы с молекулой воды. Боковая цепь карбоксильной группы

аминокислоты Glu59 образует водородную связь с молекулой воды, которая в свою очередь образует водородную связь с кислородом карбонильной группы Leu57 и кислородом карбонильной группы олигомицина (O36). Таким образом, Glu59 образует водородную связь с олигомицином через связь с молекулой воды. Остальные взаимодействия между олигомицином и С-субъединицей происходят прежде всего за счет сил ван-дер-Ваальса. (Рисунок 3.3.). Межатомные расстояния между атомами С-субъединицы и олигомицином составляют 3.7–4.9 Å. Аминокислотный остаток Phe64 образует ряд взаимодействий с шестью атомами углерода олигомицина, в том числе С2 и С3, которые имеют двойную связь с олигомицином А [Palmer et al., 2008], и, таким образом, также могут взаимодействовать с помощью π - π взаимодействий. Два аминокислотных остатка Ala56 и Ala60, каждый взаимодействует с противоположными концами молекулы олигомицина путем формирования связей между олигомицином и С-кольцом (цепи N и O). Остальные аминокислотные остатки взаимодействуют с олигомицином, образуя связь только с одной из С-субъединиц.

При изучении механизма связывания недавно изученного препарата R207910 (TMC207), который ингибирует действие АТФ-синтазы и является высокоэффективным против микобактерий туберкулеза, было выявлено, что у штаммов устойчивых к данному препарату присутствуют три независимые мутации в гене, кодирующем С-субъединицу. (Asp26Val, Ala61Pro, Phe64Met) [Andries et al., 2005; Koul et al., 2008]

В модели С – субъединицы дрожжей аминокислотный остаток Asp26 расположен в спирали 1 рядом с Gly25, который при возникновении мутации придает устойчивость к олигомицину и перекрестную устойчивость к связанным с ним лекарственным средствам [Galanis et al., 1989; Nagley et al., 1986]. Ala61 находится рядом с Ala60 у дрожжей, который является одним из двух остатков, который взаимодействует с олигомицином в обеих молекулах С – субъединицы, которые образуют сайт связывания.

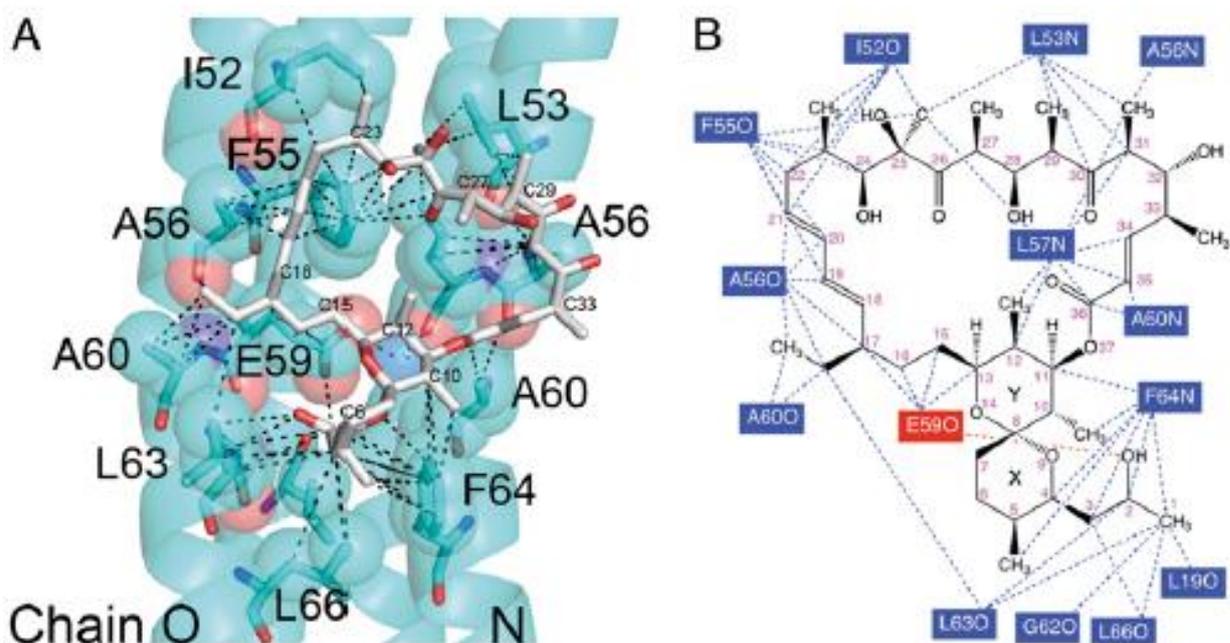


Рисунок 3.3. Взаимодействие атомов С-субъединицы с олигомицином А. (А) Атомы показаны в виде сфер, остатки показаны в виде палочек и находятся в пределах 5 Å от атомов в молекуле олигомицина. Пунктирные линии обозначают атомные расстояния в диапазоне 2,5-2,8 Å для трех водородных связей и 3,7-4,8 Å для предположительных сил ван-дер-Ваальса. (В) Взаимодействия между олигомицином А и С-кольцом. Остатки, для которых атом находится в пределах 4,8 Å, показаны пунктирными линиями (возможное взаимодействие). Одной красной пунктирной линией показано взаимодействие между E59 и гидроксильной группой олигомицина. [Symersky et al., 2012]

Мутация Ala(61)Pro вызывает излом в альфа-спирали и разрушает сайт связывания лекарственных средств. Аминокислотный остаток Ile64 соответствует Phe64 в дрожжах, который формирует критические связи с олигомицином. Хотя структура R207910 весьма отличается от олигомицина, это химическое соединение обладает некоторыми похожими химическими свойствами, что подтверждает схожесть сайта связывания олигомицина А и С-субъединицы митохондрий и бактерий. Кроме того, данный сайт связывания олигомицина А в С-субъединице может использоваться также другими ингибиторами бактериального С-кольца и, вероятно, для аналогичных ингибиторов, которые

связываются с V_0 (аналог F_0) АТФазы вакуолярного типа [Dröse et al., 1997], что может обеспечить получение еще одного потенциально целевого препарата.

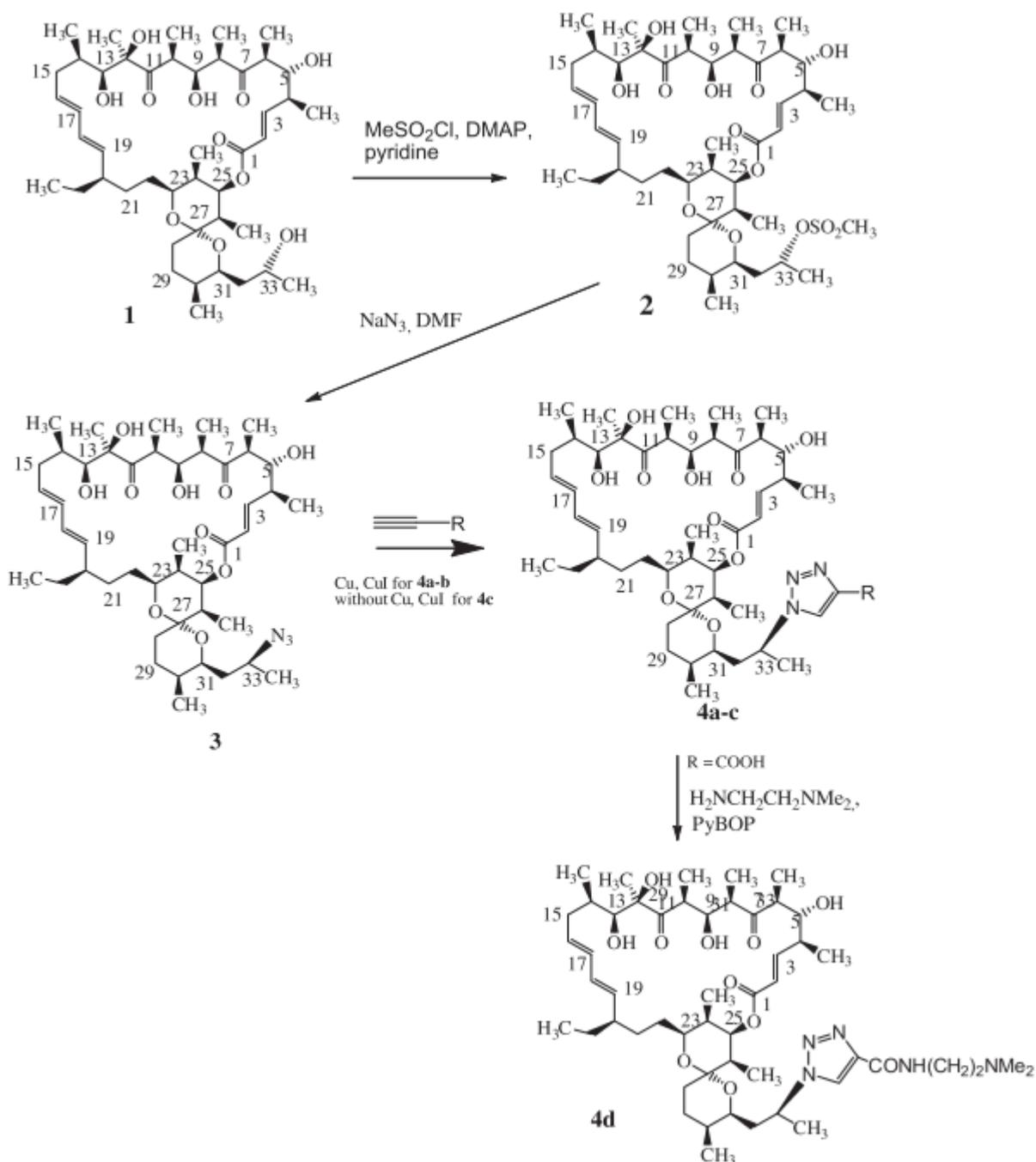
Таким образом изучение биомишеней олигомицина А и его производных являются одним из важных направлений для создания на их базе новых лекарственных средств.

Глава 4. Антибиотики группы олигомицинов. Механизмы чувствительности актинобактерий

4.1. Антибиотик олигомицин А и его производные, механизмы их действия у актинобактерий

Олигомициноподобные антибиотики, относящиеся к группе макролидов, производят многие актинобактерии в том числе *Streptomyces. sp.* WK-6150 [Enomoto et al., 2001], *S. virginiae* 17 [Danilenko et al., 2012], *S. sp.* MCI-2225 [Kobayashi et al., 1987], *S. libani* [Kim, B. S., Surk Sik Moon, S. S. & Hwang, 1999], *S. diastatochromogenes*, *S. diastaticus* [Yang et al., 2010], *Actinoalloteichus sp.* NPS702 [Sato et al., 2012] и другие. Эти штаммы являются устойчивыми к действию олигомициноподобных антибиотиков, так как являются продуцентами антибиотиков этого класса. На данный момент механизмы чувствительности у различных чувствительных к олигомициноподобным антибиотикам штаммов остаются неизученными. К такому штамму можно отнести *S. fradiae* ATCC 19609, который является сверхчувствительным для действия антибиотика олигомицина А (<0.001 нмоль/мл или 0.0005 нмоль/диск) [Alekseeva et al., 2009]. Имеющиеся данные свидетельствуют о существовании в клетках нескольких мишеней действия олигомицина А [Wender et al., 2006]. Можно предположить, что механизмы чувствительности штаммов актинобактерий к олигомицину А обусловлены несколькими биомишенями в клетке, проницаемостью антибиотика внутрь клетки, отсутствием механизма выброса антибиотика из клетки, отсутствием систем репарации клетки и другими. Для определения механизмов чувствительности, а также обнаружения дополнительных биомишеней и установления детального механизма взаимодействия с ними олигомицина А, в том числе с FoF1-АТФ-синтазой, в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе были синтезированы новые полусинтетические производные олигомицина А, селективно модифицированные по фрагментам молекулы антибиотика (33 положение

боковой цепи), которая участвует в связывании с С-субъединицей FoF1-АТФ-синтазы (Рисунок 4.1.).



a. R = Ph, b. R = COOCH₃, c. R = COOH

Рисунок 4.1. Схема синтеза 33-О-метил олигомицин А (2), (33*S*)-азидо-33-деоксиолигомицин (3) и 33-деокси-33-(1,2,3-триазол-1-yl) олигомицин А (4а-д). [Lysenkova et al., 2013]

Синтез нитрон-олигомицина осуществляли действием на олигомицин А гидрохлорида гидросиламина в пиридине в присутствии ацетата натрия [Lysenkova et al., 2009], (33S)-азидо-33-дезоксидолигомицин был синтезирован действием на 33-О-мезилолигомицина А азидата натрия в диметилформамиде при 60-65° С, 33-О-мезилолигомицин А синтезирован действием метансульфохлаорида на олигомицин А в пиридине [Lysenkova et al., 2013], а также разработан новый способ химической модификации антибиотика олигомицина А в боковой цепи (Рисунок 4.1.). Взаимодействием 33-О-мезилолигомицина с тиоцианатом калия синтезирован (33S)-33-дезоксидо-33- тиоцианатоолигомицин (Рисунок 4.2.). (33S)-33-Дезоксидо-33-тиоцианатоолигомицин показал несколько меньшую активность в отношении *S. fradiae*, чем исходный олигомицин А [Lysenkova et al., 2015].

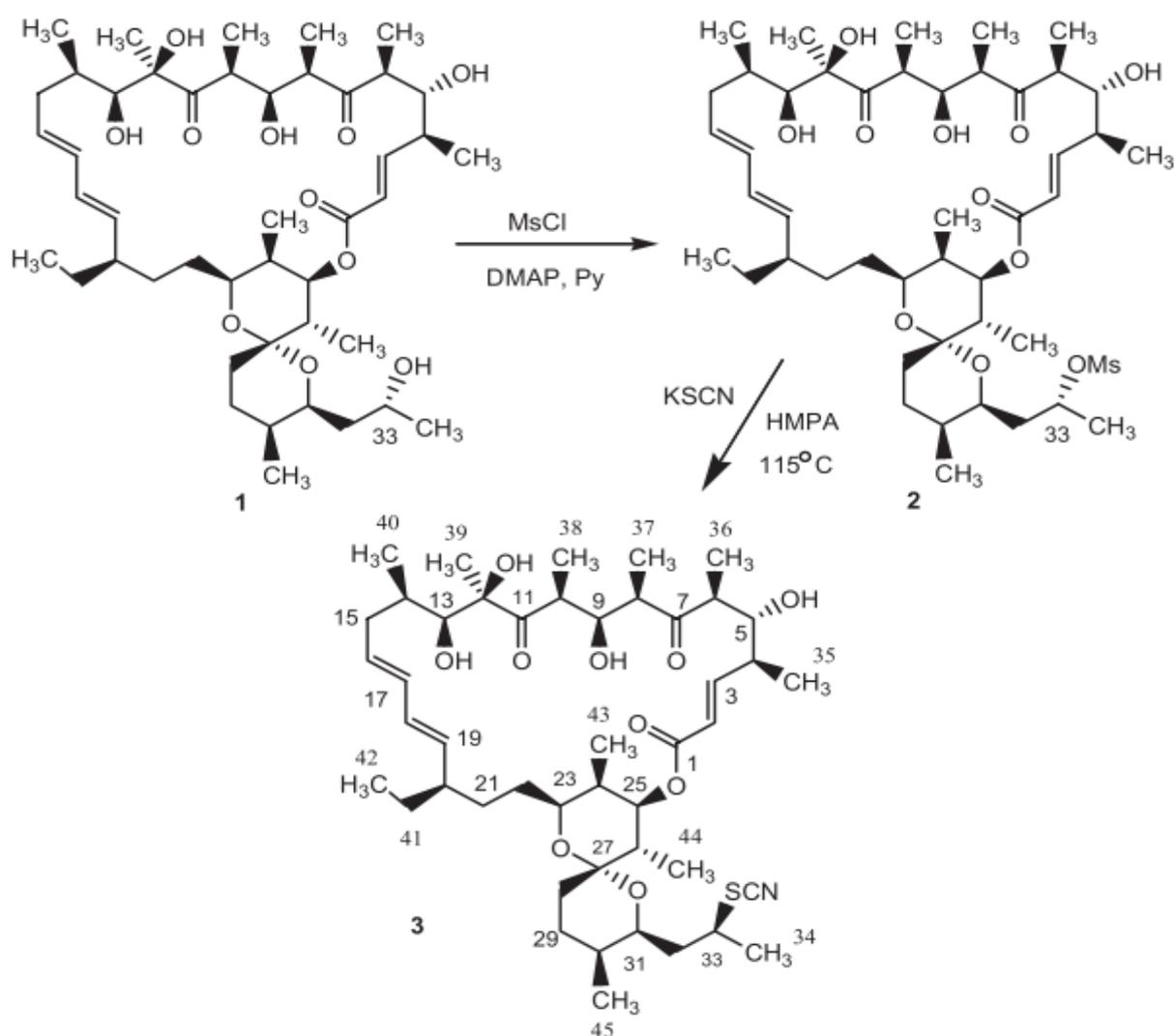


Рисунок 4.2. Синтез (33S)-33-дезоксидо-33- тиоцианатоолигомицина.

Для проверки активности новосинтезированных производных олигомицина А была использована тест-система на основе бактерий *S. fradiae* ATCC 19609, являющихся сверхчувствительными к олигомицину А. Было выявлено, что все полученные производные обладали сниженной активностью в отношении *S. fradiae* ATCC 19609, и при этом некоторые из них обладали меньшей токсичностью относительно олигомицина А.

Для дальнейшей разработки нового поколения химиотерапевтических средств необходимо выявление всех потенциальных внутриклеточных мишеней, а также исследование механизмов резистентности бактериальных клеток к действию олигомицина А и его производных.

4.2. Чувствительность и устойчивость к олигомицину А бактерий, включая актинобактерии

Большинство бактерий чувствительно к разным антибиотикам различных химических классов [Jorgensen et al., 2009]. При определении чувствительности или устойчивости штамма к какому-либо антибиотику используют следующие параметры – МИК *in vitro* такова (1-10 мкг/мл), что возможно успешное терапевтическое лечение человека – штамм считается чувствительным, МИК *in vitro* такова, что успешное терапевтическое лечение человека невозможно (более 100 мкг/мл) – штамм считается природно устойчивым [Rodloff et al., 2008]. Эукариотические штаммы, включая *Saccharomyces cerevisiae*, обладают чувствительностью к олигомицину А на уровне 25мкг/мл [Park et al., 2011], в то время как грамотрицательные бактерии являются природно устойчивыми к олигомицину А и его производным [Kim et al., 1997]. Среди грамположительных есть чувствительные к олигомицину А и его производным, относящиеся к классу актинобактерий. Бактерии рода *Streptomyces* обладают разным уровнем чувствительности к олигомицину А. МИК олигомицина А для штамма *S. albus* ATCC 21132 0,01 нм/диск [Lysenkova et al., 2015], уровень чувствительности несколько ниже *S. lividans* 66 (МИК 1 нм/диск [Alekseeva et al., 2009]). Штамм *S.*

fradiae ATCC 19609 является сверхчувствительным к олигомицину А – МИК<0.001 нмоль/мл [Lysenkova et al., 2015].

4.3. Тест система на основе *S. fradiae* ATCC 19609 для определения активности производных олигомицина А и поиска новых возможных биомишеней

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 используется в биотехнологии для продукции макролидного антибиотика тилозина. Данный штамм является сверхчувствительным к многим известным антибиотикам, в том числе к олигомицину А (<0.001 нмоль/мл или 0.0005 нмоль/диск) [Alekseeva et al., 2009] и его производным [Lysenkova et al., 2015; Lysenkova et al., 2014]. Для определения возможности использования сверхчувствительного к олигомицину А штамма *S. fradiae* ATCC 19609 в тест-системе для скрининга производных олигомицина А был проведен анализ и биохимическая характеристика единственной выявленной биомишени олигомицина А FoF1-АТФ-синтазы у семейства стрептомицетов (*S. fradiae*, *S. lividans*, и *S. avermitilis*) на препаратах выделенных инвертированных везикул. Данный анализ показал, что активность мембраносвязанной АТФазы FoF1 комплекса зависит от концентрации Mg^{2+} и умеренно стимулируется высокими концентрациями ионов Ca^{2+} (10-20 мМ). Активность АТФазы также ингибируется у стрептомицетов олигомицином А - типичными ингибитором FoF1-АТФазы. При этом высока гомология обнаруженных субъединиц АТФ синтазы у штамма *S. fradiae* ATCC 19609 (сверхчувствительного к олигомицину А) с субъединицами из штамма *S. lividans* 66 (чувствительного к олигомицину А - МИК составляет 0,1 нм/диск [Алексеева М.Г., Елизаров С.М., Беккер О.Б., Любимова И.К., 2009]) и штамма *S. avermitilis* МА4680 – продуцента олигомицина А (устойчивого к олигомицину А).

Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 рассматривается как удобная тест система для исследования ингибиторов FoF1-АТФ-синтазы бактерий, включая производные олигомицинов [Alekseeva et al., 2009; Lysenkova et al., 2014;

Lysenkova et al., 2013], так как он является сверхчувствительным к олигомицину А, а также потому, что при сравнении олигомицин-связывающих доменов с-субъединицы FoF1-АТФ-синтазы у олигомицин-чувствительных и устойчивых организмах было показано, что по данным аминокислотам *S. fradiae* ATCC 19609 имеет наибольшее сходство с *Homo sapiens* [Alekseeva et al., 2015]. (Таблица 4.1.)

Таблица 4.1. Сравнение олигомицин связывающих доменов С субъединицы FoF1-АТФ-синтазы в олигомицин чувствительных и устойчивых организмах [Alekseeva et al., 2015]

Микроорганизм	Олигомицин-связывающий домен в с-субъединице FoF1-АТФ-синтазы		
	первое а.о.	аминокислотный сиквенс***	последнее а.о.
<i>S. fradiae</i> *	54	ILGFAFCEALALIGL	68
<i>S. lividans</i> *	54	ILGFAFCEALALIGL	68
<i>S. avermitilis</i> **	58	ILGFVLCEALALIGL	72
<i>M. tuberculosis</i> **	54	FITVGLVEAAYFINL	68
<i>C. difficile</i> **	54	LLGVAIAESSAIYGL	68
<i>H. sapiens</i> *	51	ILGFALSEAMGLFCL	65

* Организмы, чувствительные к олигомицину А.

** Организмы, устойчивые к олигомицину А.

*** Аминокислоты, участвующие в связывании с олигомицином А, выделены жирным шрифтом.

Для эукариотов минимальная ингибирующая концентрация (МИК) олигомицина А составляет 25,0 мкг/мл, например для *Saccharomyces cerevisiae* [Park et al., 2011].

4.4. Противоопухолевая активность олигомицина А и его производных

Олигомицин и его аналоги демонстрируют стабильную противоопухолевую активность [Kim et al., 1997; Kobayashi et al., 1987; Yamazaki et al., 1992]. Например, олигомицин SC-1 и SC-2 проявляют антипролиферативную активность по отношению к клеткам лимфолейкоза мыши P388 ($IC_{50} = 0.0013$ и 0.00033 мкг / мл, соответственно.[Daisuke et al., 1997]). Антибиотик NK86-0279, структурный аналог олигомицина А, обладает способностью ингибировать рост различных клеток рака мыши и человека ($IC_{50} = 0,0027 \sim 2,13$ мкг / мл; [Nishikiori et al., 1991]). В исследовании с использованием клеток R-НерG2, олигомицин А вызывал апоптоз даже в доксорубин (DOX) устойчивых клетках [Li et al., 2004]. Смесь олигомицинов ABC снижает выживаемость клеток лимфолейкоза P388 до 54% при концентрации 30 пг / мл, что в $>10^3$ раз ниже, чем уровень, необходимый для ингибирования механизма дыхания. При этом олигомицин А был более эффективен, чем смесь олигомицинов ABC при ингибировании роста P388. Авторы предположили, что олигомицин А при низкой концентрации препятствует возникновению сигнальных событий апоптоза, которые различаются в опухолевых клетках и нормальных [Korystov et al., 2003]. Таким образом, механизм действия олигомицина А на сигнальные пути апоптоза имеет потенциальное применение при использовании его в качестве противоопухолевого средства.

Апоптоз в течение 12-18 часов в лимфобластоидных и других клетках млекопитающих может быть вызван митохондриальными ингибиторами (ротенон, антимицин А, олигомицин А) за счет снижения уровня АТФ [Wolvetang et al., 1994]. Было показано, что олигомицин и некоторые аналогичные антибиотики (аптолидин, оссамицин и цитоварицин) являются наиболее перспективными веществами, в которые вошли только 0,1% большинства селективных цитотоксических агентов, которые были проверены на цитотоксичность по отношению к раковым клеткам (37 000 соединений были испытаны на 60 линиях раковых клеток человека, собранных в Национальном институте рака, США)

[Salomon et al., 2000]. В менее чувствительных клетках, ингибиторы гликолиза АТФ способствовали их цитотоксическому действию. Снижение уровня АТФ также может блокировать апоптоз и / или переключить механизм апоптоза на механизм некроза. Этот эффект предполагалось использовать в качестве антиапоптозного действия, индуцированного олигомицином А во время апоптоза, индуцированного такими противоопухолевыми препаратами как этопозид и дексаметазон [Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997]. Сообщалось также и о других механизмах антиапоптотического действия олигомицина. По литературным данным олигомицин А способен блокировать димеризацию Вах (семейство проапоптотических белков Bcl-2) и также цитохром С, участвующий в процессе калфостин С-индуцированного апоптоза [Ikemoto et al., 2000]. Ингибирование цитохрома С олигомицином было также происходило в некоторых процессах Вах-независимого апоптоза [Goldstein et al., 2000; Matsuyama et al., 1998].

При изучении олигомицина А, выделенного из *S. avermitilis*, была показана его высокая противоопухолевая активность против гепатомы человека, хронического миелолейкоза, и линии клеток рака толстой кишки. Олигомицин А ингибирует пролиферацию клеток Bel-7402, K-562, и НСТ-8 в зависимости от концентрации. Степень ингибирования линий клеток Bel-7402, K-562 и НСТ-8 составляла 29,9%, 43,7%, и 53,5%, соответственно при концентрации олигомицина А $5,0 \times 10^{-5}$ мкг / мл (то есть $6,3 \times 10^{-5}$ мкМ). При этом степень ингибирования пролиферации линий клеток стандартным веществом, используемым при лечении рака желудочно-кишечного тракта флюороурацилом (5-FU) — (противоопухолевый препарат из группы антиметаболитов, антагонистов пиримидинов) при концентрации $5,0 \times 10^{-2}$ мкг / мл (то есть $3,8 \times 10^{-1}$ мкМ), была приблизительно такой же, как у олигомицина А, или способность к ингибированию не наблюдалась [Lin et al., 2009]. Таким образом, олигомицин А является более активным чем стандартное лекарственное средство 5-FU при ингибировании пролиферации линий опухолевых клеток человека.

Глава 5. Существующие подходы поиска новых биомишеней

5.1. Понятие биомишени при создании лекарственных средств

При разработке современных лекарственных средств важной задачей исследователей становится поиск новых биомишеней и понимание механизма действия лекарственного средства. Процесс разработки состоит из нескольких этапов, которые включают в себя первичный анализ коллекции соединений представленных в базе данных DrugBank, отбор перспективных химических соединений для скрининга в различных тест системах для определения их биологической активности, определение их токсичности, поиск биомишени, на которую действует лекарственное средство и определение механизма действия, доклинические и 3 фазы клинических испытаний. (Рисунок 5.1.).

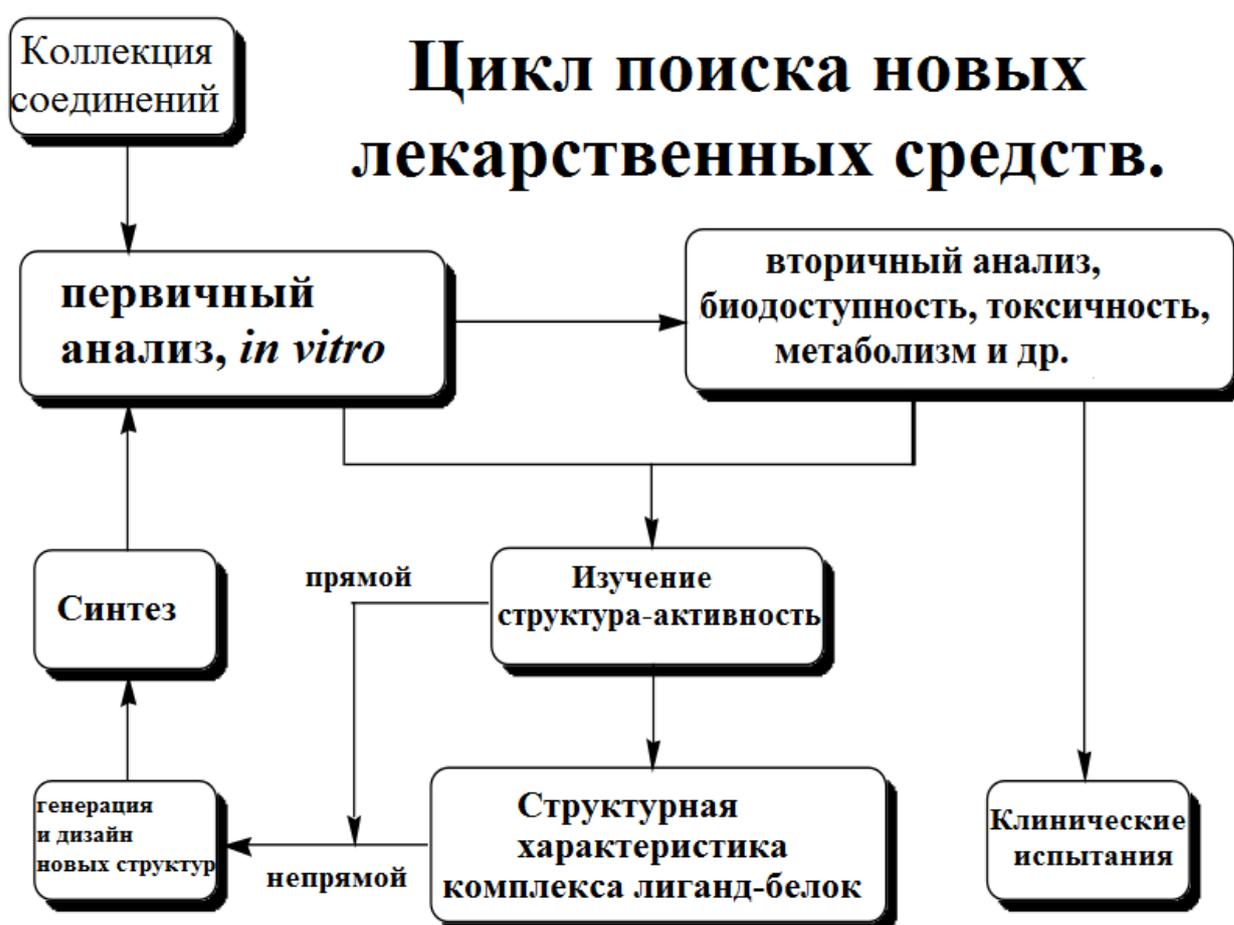


Рисунок 5.1. Схематическая диаграмма цикла разработки новых лекарственных средств.

При разработке различных новых лекарственных средств надо учитывать, что оно должно быть нетоксичным для человека и при этом высокоэффективным (обладать высокой активностью). Успешно решить эту задачу, можно только понимая механизмы действия лекарственного средства, для чего, прежде всего, необходима идентификация его биомишени. Биомишень представляет собой общий термин, который может быть применен к широкому диапазону биологических объектов, таких как, например, белки, гены, последовательность ДНК и РНК. Для разработки новых лекарственных средств необходимо иметь четкое представление о количестве, характеристиках и биологическом разнообразии существующих биомишеней.

5.2. Лекарственные средства и классификация их биомишеней

На данный момент в существующих базах данных доступны 1236 белковые биомишени, на которые действует 1317 уникальных лекарственных препаратов. Для некоторых из этих биомишеней установлены конкретные домены в белке, с которым связывается химическое вещество. При изучении литературы бывает довольно трудно установить конкретную биологическую мишень для химического соединения. К примеру, основной мишенью для цетиризина и гидроксизина является рецептор H₁ гистамина, ацебуталол действует через β_1 аденорецепторы, и при этом все эти препараты показывают связывание с другими рецепторами G-белка (GPCR) в анализах *in vitro*. В других случаях препарат действует одновременно на несколько схожих биомишеней: например, карведилол действует через блокирование ряда α - и β - адренорецепторов. Наконец, препарат может действовать несколькими путями, и поэтому иметь не связанные между собой биомишени. Например, ритонавир имеет две биомишени – он является ингибитором протеазы ВИЧ (ретровирусная аспартатная протеаза (ретропепсин)) и одновременно ингибирует метаболизм, опосредованный цитохромом P450 3A4 (CYP3A4). Ритонавир часто применяется в комбинации с другими ингибиторами ВИЧ-протеазы, таких как лопинавир. В таких случаях и

ВИЧ протеаза и цитохром СYP3A4 рассматриваются в качестве молекулярных мишеней одновременно.

Существующие препараты биологического происхождения представленных в базе данных DrugBank (группа медицинских продуктов биологического происхождения, в том числе вакцины, препараты крови, аллергены, соматические клетки, ткани, рекомбинантные белки) действуют на 76 биомишеней, а присутствующие на рынке моноклональные антитела действуют на 15 различных биомишеней человека. В настоящее время только девять биомишеней взаимодействуют с низкомолекулярными соединениями и биологическими препаратами одновременно. Обычно они действуют на разные домены или сайты связывания. Например, биологические препараты, цетуксимаб и панитумумаб действуют на внеклеточный домен рецептора тирозинкиназы EGFR (ErbB1), в то время как низкомолекулярные соединения гефитиниб и эрлотиниб действуют на часть АТФ-связывающего сайта цитозольного каталитического домена киназы, который принадлежит к тому же рецептору. На данный момент можно разбить все известные биомишени на три класса – рецепторы, ферменты и транспортеры.

На данный момент по литературным данным известно около 130 доменов белков, которые являются биомишенями для большинства лекарственных средств. Около 50% лекарственных средств нацелены на четыре основных семейства генов: GPCRs, ядерные рецепторы и трансмембранные ионные каналы (LIC и VIC), а около 60% биомишеней расположены на клеточной мембране.

Помимо этого, существует относительно небольшой, но клинически значимый класс препаратов, которые связываются с рибосомой или с последовательностью ДНК, или те, для которых биомишени не известны. Одной из основных сложностей при анализе количества биомишеней является то, что у многих препаратов часто не до конца изучены фармакологические свойства, или они обладают низкой селективностью в отношении родственных белков, а некоторые биомишени являются сложными многомерными белками с различным составом субъединиц. Понимание реальных механизмов действия существующих

фармакологических препаратов открывает возможности как для разработки новых, оптимизированных химических веществ с различной степенью селективности, так и для разработки более эффективных стратегий фармакологического действия лекарственных средств.

5.3. Проблема поиска новых биомишеней

Sakharkar и др. решили проблему поиска новых биомишеней путем определения основных бактериальных генов (т.е. таких, которые имеют существенно важное значение для роста, репликации, жизнеспособности или выживания микроорганизма), которые не имеют гомологов в человеческом геноме [Sakharkar et al., 2008]. В своей работе они изучили геном *Pseudomonas aeruginosa* и обнаружили там 309 основных жизненно важных генов, которые могут быть использованы для разработки новых антибиотиков, специфически действующих на данные биомишени. Список потенциальных мишеней для лекарственных средств включает в себя гены участвующие в трансляции, транскрипции, репликации и репарации ДНК, гены, которые кодируют белки наружной клеточной мембраны, различные пермеазы, ферменты промежуточного метаболизма, факторы взаимодействия патоген-хозяин и многие другие. Открытие новых биомишеней позволит создавать абсолютно новые антибиотики с новыми механизмами действия, что в свою очередь позволит преодолеть развивающуюся устойчивость патогенных штаммов к уже существующим антибиотикам. Таким образом, можно сказать, что поиск новых биомишеней антибиотиков является одной из самых приоритетных задач современной науки.

Глава 6. Материалы и методы

6.1. Штаммы бактерий

Streptomyces albus ATCC 21132 (ВКПМ, г. Москва), *S. fradiae* ATCC 19609, *S. lividans* 66.

6.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Синтез олигонуклеотидов проводили в компании «Синтол» и «Евроген». Последовательности используемых в данной работе праймеров представлены в Таблице 6.1. Праймеры для клонирования подбирали с использованием программы Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.). Для проведения секвенирования клонированных фрагментов в полученных плазидах последовательность олигонуклеотидов создавали при помощи программы Primer BLAST [Ye et al., 2012].

Таблица 6.1. Олигонуклеотиды, которые были использованы в данной работе.

Номер	Название	Структура олигонуклеотида 5'- 3'
1	ABCtr-PstS-f	CGACTGGAAGTACGAGGACG
2	ABCtr-PstS-r	ACCGAGTTGAGGTTGTTGCT
3	ABCtr-substr-bind-f	GTTGTCGCCCTTCTCCATCA
4	ABCtr-substr-bind-r	AAGGTCAAGGGCATGTACCG
5	br-ch-aa-ABC-tr-f	GAGGAACAGTAGCCACCGAC
6	br-ch-aa-ABC-tr-r	GAGGAACAGTAGCCACCGAC
7	alan-dehydrog-f	TGCTGCTCAAGGTGAAGGAG

8	alan-dehydrog-r	GGTCTCCACCGTCTCGTAGG
9	alk-phosph-f	CAGGATGATCGTCGAGACCT
10	alk-phosph-r	CAGCACCCGGTAGTGGATT
11	leuc-aminopeptidase-f	GAAGGACTTCGGGTGCAGG
12	leuc-aminopeptidase-r	AGAAGGACGACAAGAGCACG
13	DNA-polymerase-f	GAACGACCCGAACTGGTTGA
14	DNA-polymerase-r	CGGAGAAGGTGCAGGAGAAG
15	GTPase-Era-f	CATCCACGCCAACCTCTACA
16	GTPase-Era-r	GTCCTTGGCGACCTTCACAT
17	MarR-f	TGACCCGTCAGGTCCAGAT
18	MarR-r	GAACCAGCCCAGCAGATAGG
19	bldD-f	GAGGGGGACTGGTCGTAGAT
20	bldD-r	CCATGTGCCGCAGGAGAA
21	whiB-f	GACCGAGCTGTTCCAGCAAT
22	whiB-r	CAGACCTTCTTCGCCTCACG
23	padR-f	CGAGAAGCGGTTGACCTCG
24	padR-r	CCGTCGTGGAGGAGATCCAG
25	F0-F1C-sub-f	CACTGAGCGTTCCCAGAACC
26	F0-F1C-sub-r	ATCGGCGGGATCAGAGGATT
27	PadR-32-f	TTTTGAATTCATGCCCCCCGTCTTCGC CCA

28	PadR-32-r	TTTTAAGCTTTCAGGGGCGGTCGGGGC CGCGCA
29	PadR-16-f	TTTTCATATGATGCCCCCCGTCTTCGC CCA
30	PadR-16-r	TTTTGGATCCTCAGGGGCGGTCGGGGC CGCGCA
31	PadR-S-ex-f	GCCGTGCTGTCCGTCC
32	PadR-S-ex-r	GGACGCCGCGGACAC
33	PadR-S-in-f	CGAGAAGCGGTTGACCTCG
34	PadR-S-in-f	CCGTCGTGGAGGAGATCCAG
35	helicase-f	CGCCGGATTGCGGTAGTT
36	helicase-r	GGCCCTCTCTCCGTCCAC

6.3. Культивирование бактерий

Штамм *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 выращивали на твердой агаризованной среде Cp-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 28⁰C.

Штамм *Streptomyces albus* ATCC21132 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 28⁰C.

Штамм *Streptomyces 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 дней при температуре 28⁰C.

6.4. Методика определения антибактериальной активности веществ

Проверка антибактериальной активности осуществлялась на штаммах стептомицетов методом дисков и заключалась в определении зоны подавления роста штамма, засеянного газонем на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих антибиотики в различных концентрациях. Для приготовления газона споровую суспензию, полученную путем смыва с агаризованной полноценной среды и пропущенную через ватный фильтр, смешивали с агаризованной средой MD (0,8% агара) (K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4$ 0,05%, NaCl 0,05%, $FeSO_4$ 0,001%, KNO_3 0,1%, крахмал 1%, агар 2%) при pH 7,5 в соотношении 1×10^5 спор на чашку Петри и засеивали чашки с агаризованной средой MD (2% агара). После застывания агаризованной споровой суспензии, на чашки наносили бумажные диски, содержащие тестируемые соединения. Выращивание газона производили в течение 24 часов при +28°C. Среда MD следующего состава: 0.5% мальт экстракта (Sigma), 0.4% дрожжевого экстракта (Difco), 0.05% NaCl, 0.05% $MgSO_4$, 0.05% K_2HPO_4 , 0.0001% $FeSO_4$, 0.1% KNO_3 , 2% глюкозы, pH 7.5.

6.5. Получение штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А.

Для определения МИК производных олигомицина, получали споровую суспензию *S. fradiae* смывом водой с содержанием TWIN 80%, и высевали в полужидком агаре верхним слоем на чашки Петри с твердой агаризованной средой MD-2%, содержащей производные в различных концентрациях.

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 6×10^9) высевали в полужидком агаре верхним слоем на чашки Петри со средой MD-2%, содержащей производные олигомицина А в различных концентрациях. Для определения количества КОЕ в первичной суспензии была

проведена серия последовательных десятикратных разведений. Из каждого разведения на агаризованную среду MD-2% высевали аликвоту и выращивали 3 суток при температуре 28⁰С. После этого производили отбор и моноклональный рассев выросших колоний на среде Ср-15, содержащей производное олигомицина А в различных концентрациях.

Для характеристики дикого типа и мутантов *S. fradiae* ATCC 19609 по спектру устойчивости к антибиотику олигомицину А и его производным, а также к другим антибиотикам 10⁵ КОЕ высевали в полужидком агаре (0,8%) в верхнем слое на чашки Петри с твердой агаризованной средой MD-2%. Эксперимент проводился в трех независимых повторах.

6.6. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами

6.6.1. Выделение тотальной ДНК

Для выделения тотальной ДНК, штамм *S. fradiae* ATCC 19609 выращивали в течение 14 дней на твердой агаризованной среде Ср-15, затем в посевной жидкой среде (крахмал 3%, кукурузный экстракт 1%, (NH₄)₂SO₄ 0,4%, CaCO₃ 0,5%, NaCl 0,5%, pH=7,1) в течение 48 часов и после в среде YEME (дрожжевой экстракт 0,3%, бакто пептон 0,5%, мальт экстракт 0,3%, глюкоза 1%, сахароза 25% pH=7,1) в течение 48 часов при 28⁰С. Было произведено выделение ДНК с использованием стандартных методик выделения для актинобактерий рода *Streptomyces* [Hopwood et al., 1985]. Выделенную ДНК очищали с помощью набора GenElute Bacterial Genomic DNA Kits SIGMA NA2110-1КТ.

6.6.2. Выделение РНК

Для выделения РНК, биомассу *S. fradiae* выращивали в среде YEME до достижения первой половины log фазы. После этого в среду добавляли производное олигомицина А для индукции штамма дикого типа *S. fradiae* и для индукции мутантного штамма. Дальнейшие 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).

6.6.3. Полногеномное секвенирование полученного штамма

Полногеномное секвенирование проводилось с использованием стандартных наборов и программ Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). Полученные риды 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).

6.6.4. Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля

Для выделения фрагмента ДНК использовался набор GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) или QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Выделение проводили из 1% агарозного геля.

6.6.5. Очистка ДНК из реакционной смеси

Для очистки полученной ДНК из реакционной смеси (после проведения амплификации, рестрикции или лигирования) использовали наборы GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) или QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

6.6.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовался для амплификации ДНК. Реакцию проводили с использованием набора High Fidelity

PCR Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) на приборах CFX96 (Bio-Rad), SpeedCycler2 (AnalyticJena) и Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология). Реакционная смесь содержала: 1× буфер для ПЦР, $MgCl_2$ 1,5mM, $\Sigma dNTPs$ 0,5 mM каждого, смесь ферментов из расчета 5 е.а. на 100 мкл смеси, праймеры по 20 нг на 100 мкл смеси, а также матричную ДНК в количестве от 1 до 100 нг на 100 мкл смеси. Температура отжига была подсчитана программой, в которой создавали праймеры. В отдельных случаях оптимальную температуру отжига подбирали с помощью прибора Bio-Rad CFX96 с использованием технологии температурного градиента.

Время элонгации рассчитывалось как 1 мин на 1 т.п.н.

6.6.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Для определения количества и длины полученных фрагментов ДНК был проведен электрофорез с использованием 1% агарозного геля. Агарозу (“Amresco”, США) плавил в электрофорезном буфере TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6). Электрофорез проводили с использованием ванночки электрофорезным буфером. Пробы наносили в лунки геля с добавлением 6-кратного красителя “6x Loading Die” (ThermoFischer Scientific, США), в качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК фага λ , рестрицированного по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* (ThermoFischer Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler – 50 bp Plus, 100 bp Plus (ThermoFischer Scientific, США). Электрофорез проводили при напряжении 5-7,5 В/см.

6.6.8. Определение количества ДНК

Ориентировочную концентрацию ДНК в пробе определяли по полученной электрофореграмме. Точную концентрацию ДНК в пробе определяли с использованием набора Qubit dsDNA BR Kit (ThermoFischer Scientific, США) на приборе Qubit (ThermoFischer Scientific, США) по инструкции производителя.

6.7. Манипуляции с белками

6.7.1. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Для анализа общих лизатов белков проводили электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по [Laemmli, 1970]. Состав разделяющего геля: 375 мМ Tris-Cl, 0,025% SDS, 12,5% акриламид, 5% глицерина, pH=8,8. Состав концентрирующего геля: 125 мМ Tris-Cl, 0,025% SDS, 5% акриламид, pH=6,8. Раствор 30% акриламида готовили в следующей пропорции: 29,2% акриламида, 0,8% метилен-бисакриламида. Для полимеризации геля добавляли 0,1% PSA и 1 мкл/мл TEMED. В карманы геля вносили лизаты, содержащие 20-30 мкг фракции растворимого белка. Электрофорез проводили при напряженности по концентрирующему гелю 7,5 В/см, по разделяющему – 9-10 В/см. Состав электродного буфера: 25 мМ Trisma base, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH=8,3-8,4.

По окончании фореа гель помещали на 20 мин в фиксирующий раствор следующего состава: 150 мл этанола, 40 мл ледяной уксусной кислоты, 110 мл воды. Окрашивание проводилось при нагревании красителем кумаси G-250 в растворе следующего состава: 0.4 г кумаси G-250, 80 мл 96% спирта, 40 мл ледяной уксусной кислоты 180 мл H₂O. Гель отмывали 7% уксусной кислотой при нагревании.

6.7.2 Двумерный электрофорез и масс-спектрометрический анализ

Двумерный гель-электрофорез (SDS-PAGE) проводили в соответствии с методом [O'Farrell, 1975] с незначительными изменениями. Образцы для масс-спектрометрии были получены методом, рекомендованным Promega (США); Масс-спектры были получены методом, рекомендованным Bruker Daltonics (США) на аналитическом масс-спектрометре Bruker Daltonics (UltrafleXtreme MALDI TOF / TOF MS) (Bruker Daltonics GmbH, Германия) на кафедре

протеомных исследований, Научно-исследовательского института биомедицинской химии, России академии наук. Белки были определены с использованием программного обеспечения Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI.

6.8. 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, для анализа экспрессии генов проводили количественный ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR Green, на амплификаторе Bio-Rad CFX96 Touch.

Условия амплификации.

Программа для амплификации фрагментов при анализе экспрессии генов (праймеры 1-24):

94°C – 1 мин;

{94°C-30 сек., 60°C-30сек., 72°C-1мин} 50 циклов;

72°C-10мин.

6.9. Биоинформатические методы

Последовательности генов были получены из базы данных GenBank NCBI.

Гомологию аминокислотной последовательности белков исследовали в программе BLAST [Johnson et al., 2008].

Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega [Sievers et al., 2011]. Для построения филогенетического дерева использовали программу Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) версии 6.06 [Tamura et al., 2013], дерева строили по методу присоединения соседей (neighbour-joining). Поиск кластеров генов, предположительно ответственных за

биосинтез вторичных метаболитов проводили с помощью программы antiSMASH 3.0 [Weber et al., 2015].

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).

6.10. 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 37⁰С 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 с интервалом между обработками 15 с при 40 С. Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 40⁰С и 10 000 g. Для выделения везикул белки супернатанта центрифугировали в течение 1 ч при 40 С 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 40 С и 280 000 g. Полученные осадки растворяли в пяти объемах того же буфера с добавлением глицерина до 10%. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [Bradford, 1976]. Фракцию инвертированных мембранных везикул замораживали в жидком азоте и хранили при –70⁰ С.

6.11. 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 используя стандартную методику с небольшими модификациями, а именно подбором концентраций действующих веществ [Koul et al., 2007]. 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.

Инвертированные мембранные везикулы разводили до конечной концентрации 50 мкг белка в 1 мл буфера, содержащего 50 mM MOPS, pH-7,5, 10 mM MgCl₂ и прединкубировали с контрольным ингибитором или с олигомицином А в течение 10 мин при перемешивании при комнатной температуре. Для валидации тест-системы были использованы стандартные ингибиторы FoF1-АТФ-синтазы: N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD, «Alfa Aesar», Вкликобритания) [Toei et al., 2013], Oligomycin А (чистота 95% , получен в АНО «НИЦ «БИОАН», Россия) [Pagliarani et al., 2013]. В качестве отрицательного контроля использовали Levofloxacin («Sigma», США) [Koul et al., 2007]. В реакционную смесь вносили NADH до конечной концентрации 2,5 mM и инкубировали при энергичном встряхивании в течение 1 мин при комнатной температуре. Реакцию начинали добавлением АДФ до конечной концентрации 1 mM и K₂HPO₄ до конечной концентрации 10 mM. Аликвоты реакционных смесей (в трех повторах, объемом 100 мкл) забирали по прошествии 1 мин, 10 мин, 20 мин, 40 мин и 60 мин инкубации и добавляли к 400 мкл ледяного раствора, содержащего 2 mM ЭДТА, 1% ТХУ. Все дальнейшие манипуляции проводили с использованием автоматизированной лабораторной рабочей станции Biomek 3000® («Beckman Coulter», США). 5 мкл смеси добавляли к 100 мкл буфера, содержащего 100 mM Tris-НОAc, 2 mM ЭДТА, pH 7,75, и перемешивали в лунках

96-луночного планшета. Затем, в лунки вносили 50 мкл люциферазного реагента (ATP bioluminescence Assay Kit HS II, «Sigma», США). Люминесцентный сигнал (RLU- relative light units) - измеряли, используя DTX 880 Multimode Detector («Beckman Coulter», США). Параметры измерения: время –1000 мс, чувствительность измерения – expected high activity. Все измерения проводились в пяти повторностях.

Глава 7. Результаты и обсуждение.

7.1. Экспериментальная схема исследования.

Для исследования генетических механизмов устойчивости и чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным в первую очередь было необходимо провести характеристику данного штамма по уровню устойчивости к антибиотикам различных химических классов, в том числе к макролидным антибиотикам. После определения чувствительности данного штамма к антибиотикам различных химических классов было необходимо провести поиск предполагаемых генов, которые могут быть вовлечены в процесс формирования устойчивости. Для этого впервые было проведено полногеномное секвенирование штамма *S. fradiae* ATCC 19609. В процессе биоинформатического анализа было обнаружено более 20 генов, вовлеченных в процесс формирования устойчивости к антибиотикам различных химических классов. Для антибиотика олигомицина А по литературным данным известна единственная биомишень FoF1–АТФ-синтаза. Для изучения способности олигомицина А ингибировать FoF1–АТФ-синтазу нами был проведен эксперимент по изучению способности олигомицина А ингибировать АТФ-синтазную активность в везикулах *S. fradiae* ATCC 19609. Так как было выявлено, что олигомицин А ингибирует АТФ-синтазную активность только на 30% было высказано предположение, что в клетке *S. fradiae* ATCC 19609 существует одна или несколько дополнительных биомишеней олигомицина А. Попытки получения мутантов, устойчивых к олигомицину А, не увенчались успехом, поэтому для определения дополнительных возможных механизмов устойчивости к олигомицину А и его производным нами были получены два мутантных штамма *S. fradiae*, устойчивых к нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину, которые предположительно должны были действовать на дополнительные механизмы устойчивости или на дополнительную биомишень, отличную от FoF1–АТФ-синтазы. Для выявления мутаций в геноме, которые

могли бы приводить к возникновению устойчивости к производным олигомицина А нами было проведено полногеномное секвенирование мутантных штаммов, которое позволило выявить единичные нуклеотидные замены в каждом штамме. Была выявлена мутация в гене *padR* (полифункциональном транскрипционном регуляторе) у мутантного штамма, устойчивого к нитрон-олигомицину и мутация в гене хеликазы IV у мутантного штамма, устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину. Следующим этапом работы было изучение возможных механизмов устойчивости, обусловленных мутациями в этих генах, с помощью биоинформатических и экспериментальных методов, а именно определение изменения экспрессии генов, возможно контролируемых PadR и попытка установить механизм возникновения устойчивости к данным производным (Рисунок 7.1.).

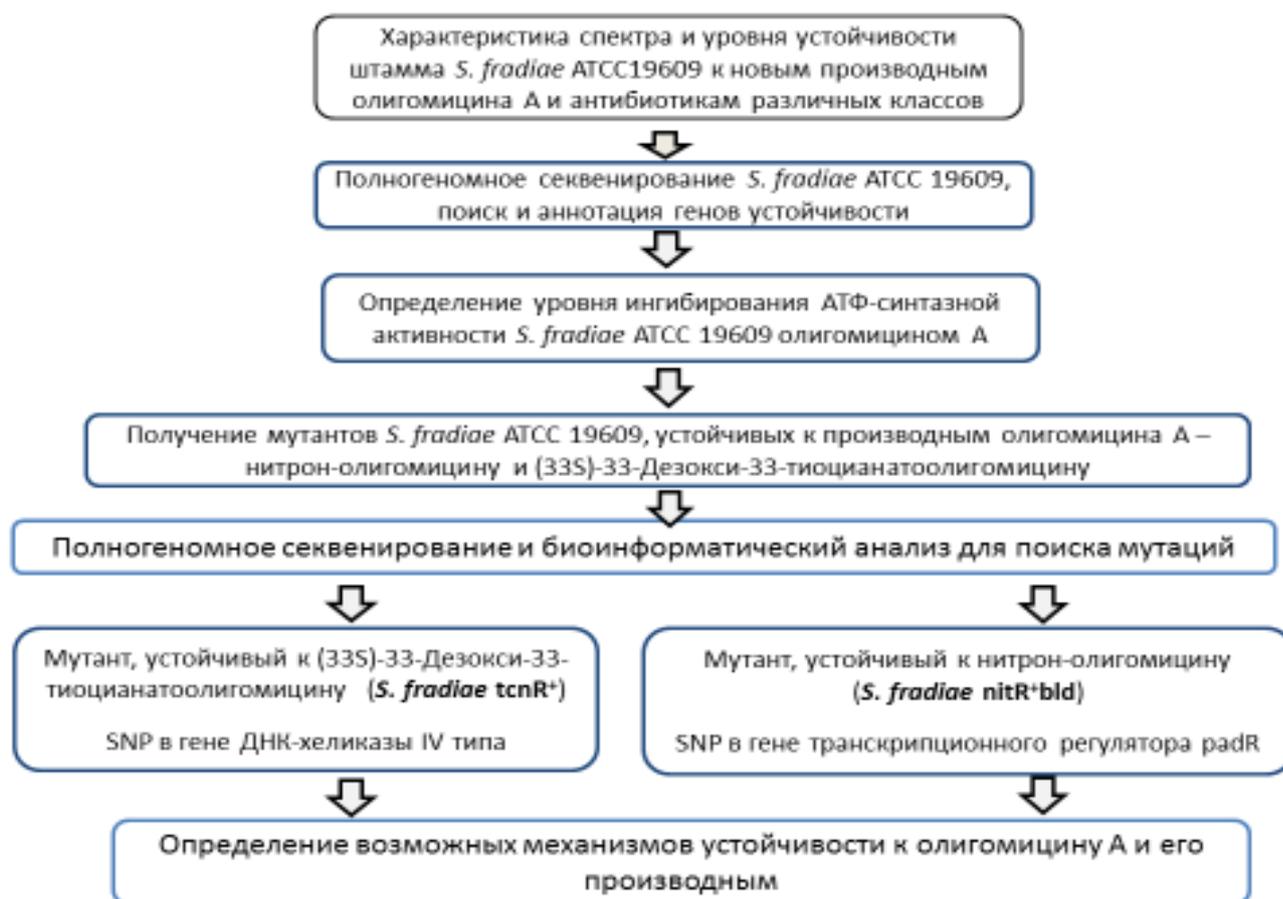


Рисунок 7.1. Схема эксперимента определения возможных механизмов устойчивости к олигомицину у актинобактерий *S. fradiae* ATCC 19609.

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

Штамм *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 - актинобактерии, выделенные из почвы. Данный штамм 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 *Streptomyces lividans* 66 [Bekker et al., 2008], 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 была проведена методом дисков. Эксперимент проводился в сравнении с модельным штаммом *S. lividans* 66 и непатогенным штаммом *S. albus* ATCC 21132 (Таблица 7.1). Было выявлено, что *S. fradiae* ATCC 19609 является более чувствительным к аминогликозидным антибиотикам стрептомицину, тобрамицину, гентамицину, неомицину, амикацину, а также к макролидным антибиотикам, эритромицину, олеандомицину, азитромицину и антибиотикам линезолиду и хлорамфениколу. При этом *S. albus* ATCC 21132 оказался устойчивым к антибиотикам рифампицину и линкомицину, а устойчивость штаммов *S. lividans* и *S. albus* к антибиотикам класса макролидов оказалась приблизительно на одном уровне. Уровень устойчивости к аминогликозидным антибиотикам был разным у всех трех штаммов, но *S. lividans* был наиболее устойчив к антибиотикам данного класса.

Таблица 7.1. Характеристика спектра устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609, *S. lividans* 66 и *S. albus* ATCC 21132 к антибиотикам различных химических классов методом дисков.

Антибиотик	Концентрация, мкг/диск	Зона подавления роста, мм*		
		<i>S. fradiae</i> ATCC 19609	<i>Streptomyces albus</i> ATCC 21132	<i>S. lividans</i> 66
Стрептомицин	10	51±1	39±1	7±1
Тобрамицин	10	36±1	25±1	0
Гентамицин	10	36±1	25±1	8±1
Канамицин	30	24±1	35±1	0
Эритромицин	15	28±1	9±1	12±1
Олеандомицин	15	30±1	8±1	8±1
Клиндамицин	10	36±1	9±1	32±1
Азитромицин	15	34±1	13±1	16±1
Линкомицин	10	28±1	0	20±1
Окситетрациклин	30	20±1	30±1	23±1
Хлорамфеникол	30	48±1	14±1	23±1
Рифампицин	2	30±1	0	29±1
Офлоксацин	5	12±1	14±1	15±1
Амикацин	30	51±1	35±1	30±1
Рокситромицин	5	8±1	12±1	10±1
Неомицин	5	29±1	16±1	6±1
Линезолид	10	38±1	29±1	12±1

* Эксперимент выполнен в трех независимых повторностях.

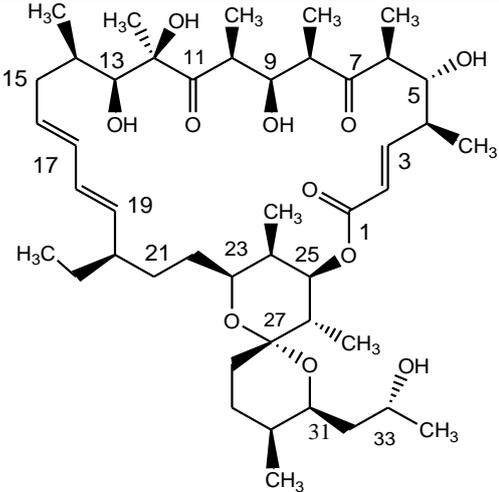
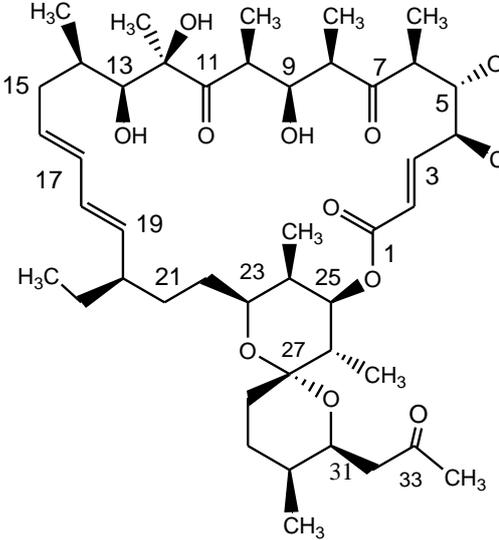
В большинстве случаев диаметры зон подавления роста *S. fradiae* ATCC 19609 антибиотиками больше, чем диаметры зон подавления роста *S. lividans* 66 и *S. albus* ATCC 21132, что говорит о более высоком уровне чувствительности *S. fradiae* ATCC 19609 к антибиотикам.

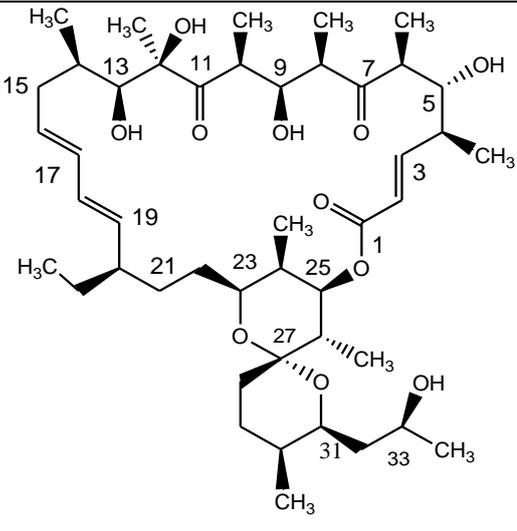
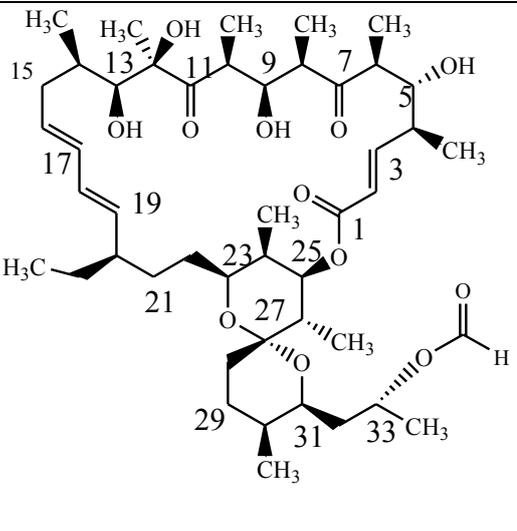
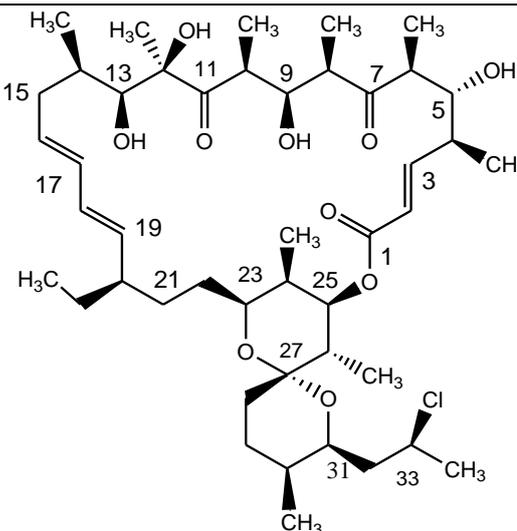
7.3. Характеристика устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным

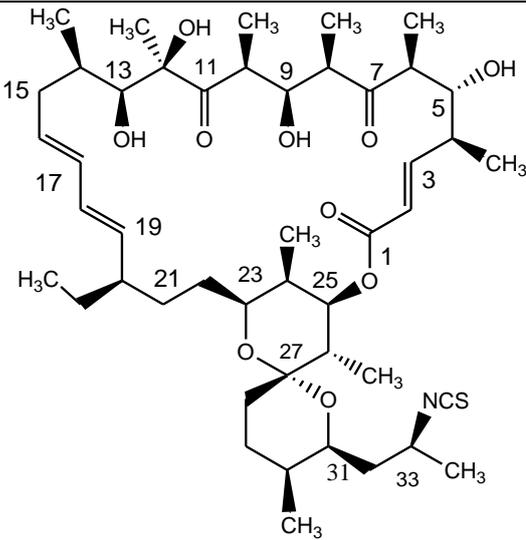
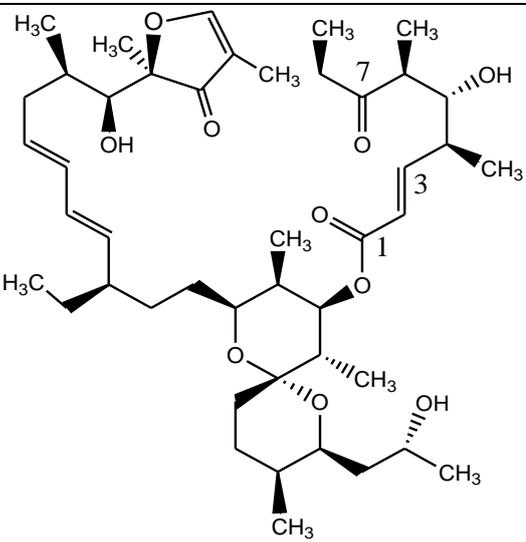
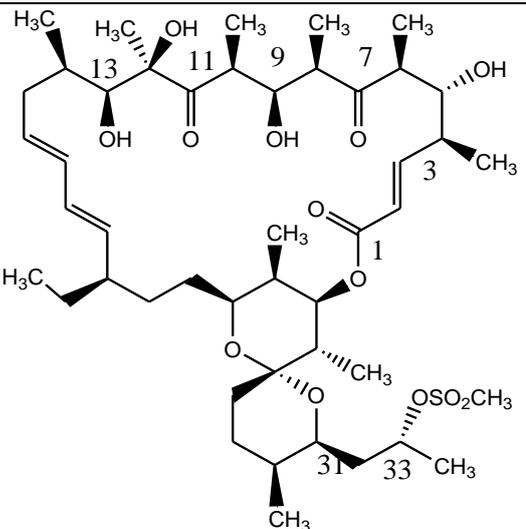
В процессе настоящей работы, совместно с ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф.Гаузе» было синтезировано более 20 новых полусинтетических производных олигомицина А. Для определения влияния изменения химической структуры олигомицина А было проведено определение активности олигомицина А и его производных в тест-системе *S. fradiae* ATCC 19069 (Таблица 7.2). Определение проводили методом дисков, МИК считалась та концентрация, при которой диаметр зоны ингибирования роста был минимальным (7 мм). Результаты анализа активности производных олигомицина А позволили разделить их на три группы: наименее активные (10 нмоль/диск) – 8 веществ, обладающие средним уровнем активности (0.05–1 нмоль/диск) – 10 веществ, наиболее активные (0.01–0.05 нмоль/диск) – 4 вещества – некоторые из них представлены в Таблице 7.2 (остальные см. Приложение). Было выявлено что на снижение уровни активности влияет заместитель при С-33 атоме углерода в макроциклическом лактонном кольце. В результате тестирования установлено, что изомер олигомицина А по С-33 положению обладает на порядок более низкой активностью, чем олигомицин А, но при этом является наиболее активным веществом из всех тестируемых соединений. Олигомицин-33-формиат и хлоролигомицин обладали в 50 раз меньшей активностью, чем олигомицин А. Активность (33S)-33-бromoолигомицина А и (33S)-азидо-33-дезоксиполигомицин снижена в 500 раз (по сравнению с олигомицином А). При этом получение изомеров по С33 атому у соединений (33S)-33-дезоксиполигомицин и (33S)-азидо-33-дезоксиполигомицин снижает активность веществ в 10 раз, относительно исходных (МИК (33S)-33-дезоксиполигомицина 1 нм/мл, МИК (33S)-азидо-33-дезоксиполигомицин - 0,5 нм/мл). Введение атома азота в макроциклическое кольцо у нитрон-олигомицина приводит к падению активности в 10 000 раз, относительно олигомицина А. Ретроальдольное расщепление олигомицина А по

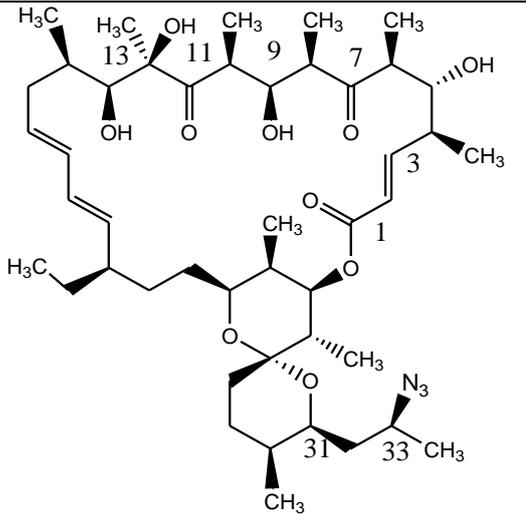
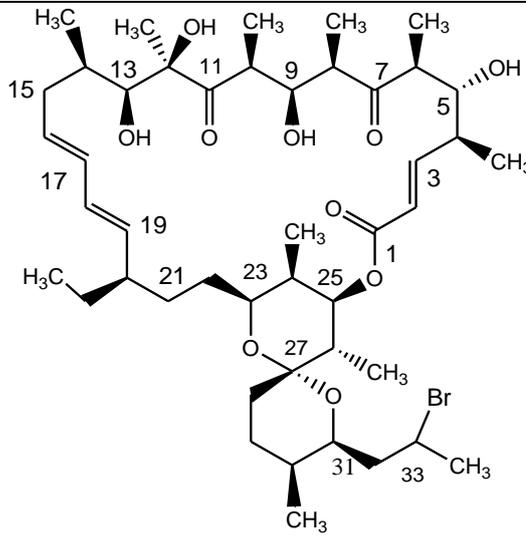
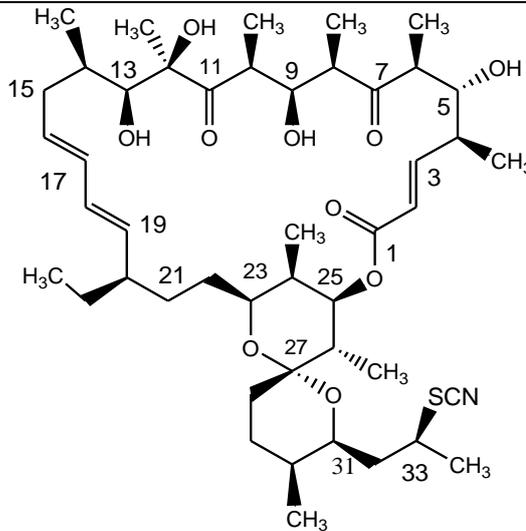
С8-С13 связям приводило к падению активности в более чем 100 000 раз относительно олигомицина А.

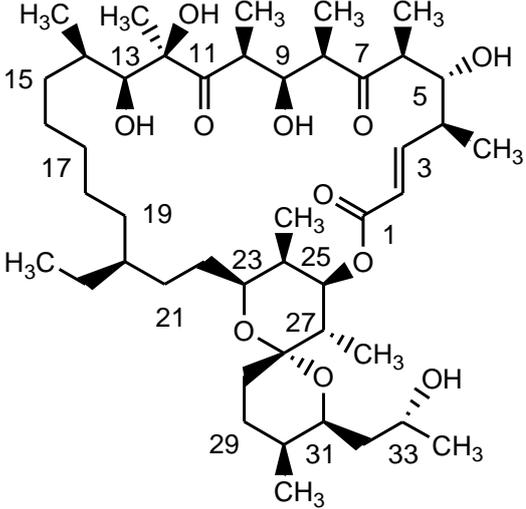
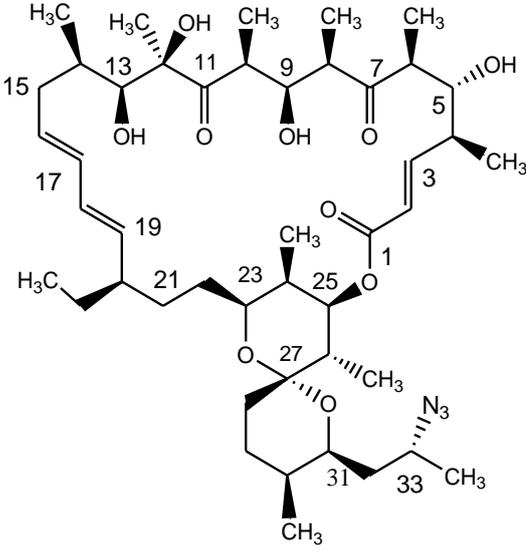
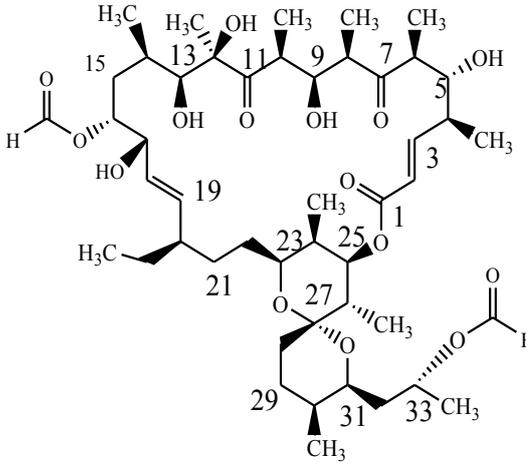
Таблица 7.2. Активность производных олигомицина А в отношении штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609.

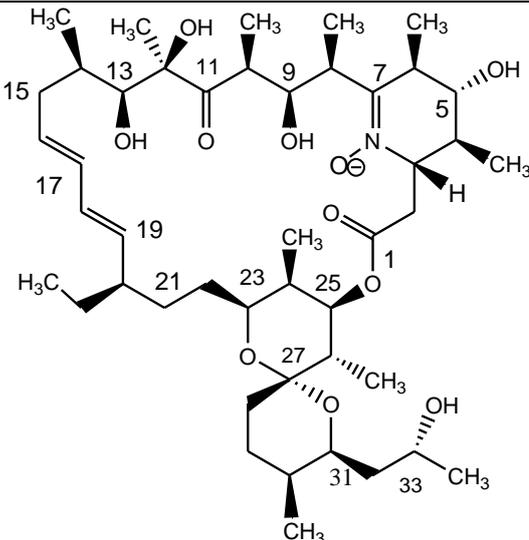
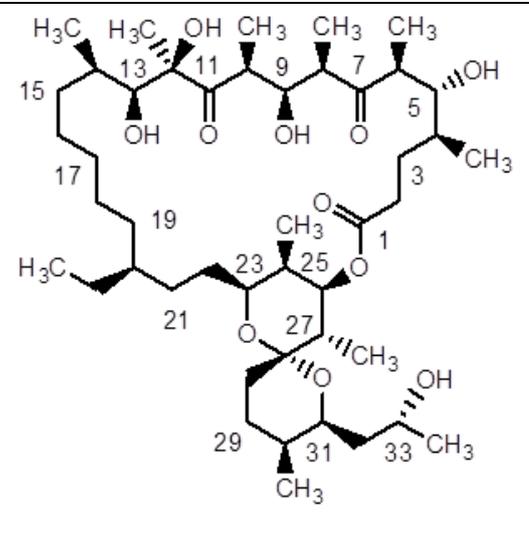
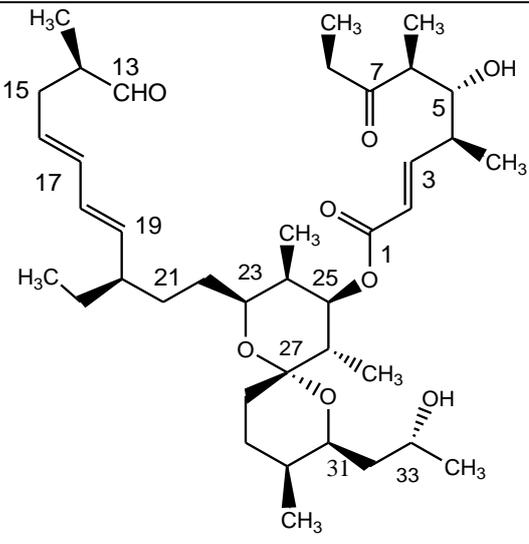
Химическое вещество	Структурная формула	МИК нмоль/диск
Олигомицин А		0,001
33-дегидроолигомицин		0,005

<p>(33<i>S</i>)-Олигомицин А (Olg 12)</p>		0,01
<p>Олигомицин-33-формиат (Olg 16)</p>		0,05
<p>(33<i>S</i>)-33-дезокси-33-хлороолигомицин</p>		0,05

<p>(33S)-33-дезокси-33-изотиоцианатолигомицин</p>		0,1
<p>ациклическое производное дегидролигомицина</p>		0,1
<p>33-O-мезилолигомицин, (Olg3)</p>	 <p>[Lysenkova et al., 2013]</p>	0,1

<p>(33<i>S</i>)-азидо-33- дезоксиполигомицин (Olg 2)</p>	 <p>[Lysenkova et al., 2013]</p>	0,5
<p>33-(<i>R,S</i>)-бромо-33- дезоксиполигомицин (Olg 5)</p>		0,5
<p>(33<i>S</i>)-33-дезоксиполигомицин тиоцианатоолигомицин (Olg4)</p>	 <p>[Lysenkova et al., 2015]</p>	1

<p>16,17,18,19- тетрагидроолигомицин А</p>		1
<p>(33<i>R</i>)-азидо-33- дезоксоолигомицин А (Olg 6)</p>	 <p>[Lysenkova et al., 2013]</p>	5
<p>17-гидроксиолигомицин- 16,33-диформиат (Olg 15)</p>		10

<p>нитрон-олигомицин, (Olg1)</p>	 <p>[Lysenkova et al., 2009]</p>	10
<p>2,3,16,17,18,19- Гексагидроолигомицина А (Olg 17)</p>		>10
<p>Ретроальдольное расщепление олигомицина А по C8-C13 связям</p>		100

Для подтверждения сверхчувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 были определены МИК олигомицина А и используемых в работе производных в сравнении с штаммами *S. albus* ATCC 21132 и *S. lividans* 66. Штамм *S. fradiae* ATCC 19609 оказался наиболее чувствительным к олигомицину А, нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину (Таблица 7.3.).

Таблица 7.3. 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-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицина, Olg4	1	10	>100
нитрон-олигомицин, Olg1	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 в биологических свойствах антибиотиков этого ряда, что согласуется с данными рентгеноструктурного анализа комплекса олигомицина А с FoF1-АТФ-синтазой [Symersky et al., 2012].

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

FoF1-АТФ-синтаза является полностью реверсивным двигателем, в котором направление вращения переключается в зависимости от функции, которую в данный момент выполняет фермент: синтез или гидролиз АТФ. В режиме гидролиза, протонный насос F₁-домена переносит протоны против

электрохимического градиента через мембрану встроенной Fo- части, превращая АТФ в АДФ и неорганический фосфат [Guo et al., 2016]. FoF₁-АТФ-синтаза представляет несомненный интерес для исследований, в качестве биологической мишени для разработки различных классов препаратов и антибиотиков [Balemans et al., 2012; Shah et al., 2015]. 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 в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН тест-системе. Для определения ингибирующего действия олигомицина А проводилось изучение кинетики синтеза АТФ на модели инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*. Для этого проводилось сравнение кинетики реакции синтеза АТФ FoF₁-АТФ-синтазой интактных инвертированных мембранных везикул (int inv) и предобработанных олигомицином А (olg А) (100мкМ) мембранных везикул. В качестве контроля проводили обработку известным ингибитором АТФ-синтазной активности дициклогексилкарбодиимидом (DCCD) в конечной концентрации 100 мкМ.

Определение АТФ-синтазной активности проводилось с использованием набора АТР Bioluminescence Assay Kit HS II на основании уровня люминесценции АМФ в следующей реакции:



На Рисунке 7.2. представлены результаты, полученные при сравнении кинетики синтеза АТФ FoF₁-АТФ-синтазой интактных инвертированных мембранных везикул и везикул предобработанных DCCD и olg А. Как видно из графика в начальной точке уровень люминесценции у интактных необработанных везикул почти в два раза выше, чем у предобработанных олигомицином А везикул, а уровень люминесценции у предобработанных DCCD везикул не детектировался. В следующих точках (10 мин, 20 мин, 30мин, 40 мин, 50 мин, 60 мин.) уровень синтеза АТФ также был выше в необработанных везикулах, уровень люминесценции в везикулах предобработанных олигомицином А был в

среднем в два раза ниже, а обработанных стандартным ингибитором АТФ-синтазной активности в 4 раза меньше относительно интактных везикул.

Единственная известная биомишень для 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 биомшеней 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 дициклогексилкарбодиимида и олигомицина А, представлена на Рисунке 7.3.

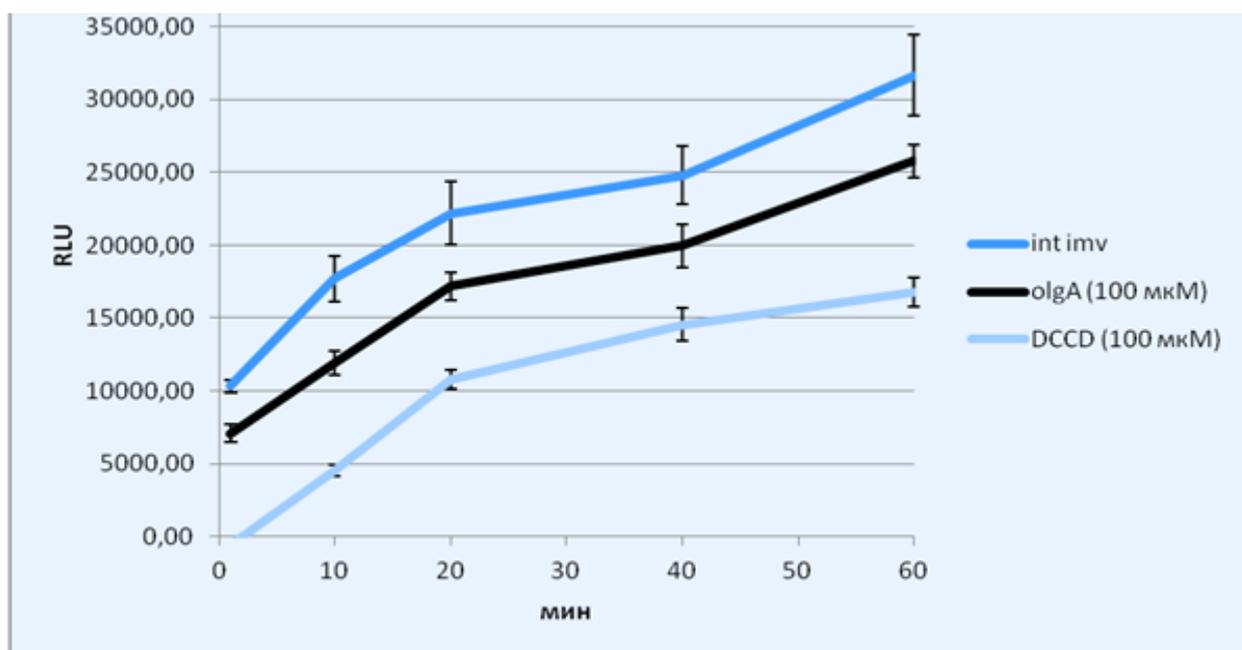


Рисунок 7.2. Изучение кинетики синтеза АТФ FoF1-АТФ-синтазой в препаратах интактных инвертированных мембранных везикул *S. fradiae* (int imv), в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*, предобработанных дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ). На вертикальной оси представлены значения RLU- relative light units, на

горизонтальной оси представлены интервалы времени, в которые проводились измерения.

Показано, что наибольшее ингибирующее влияние дициклогексилкарбодиимид оказывает в течение первых 10 минут прохождения ферментативной реакции (105 - 74 %). Процент ингибирования, определенный на 1 мин. прохождения ферментативной реакции (105,9), может объясняться содержанием примесной АТФ в препарате АДФ ($\geq 95\%$, («Sigma», США). Степень ингибирования олигомицином А достигает максимума к 10 мин и несколько снижается после 20 мин. Максимальная степень ингибирования олигомицином А составляет 31,3%.

В качестве отрицательного контроля был использован левофлоксацин (конечная концентрация 100 мкМ). Показано, что левофлоксацин не оказывает влияния на синтез АТФ FoF1-АТФ- синтазой инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*, что позволяет использовать его в качестве отрицательного контроля.

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.

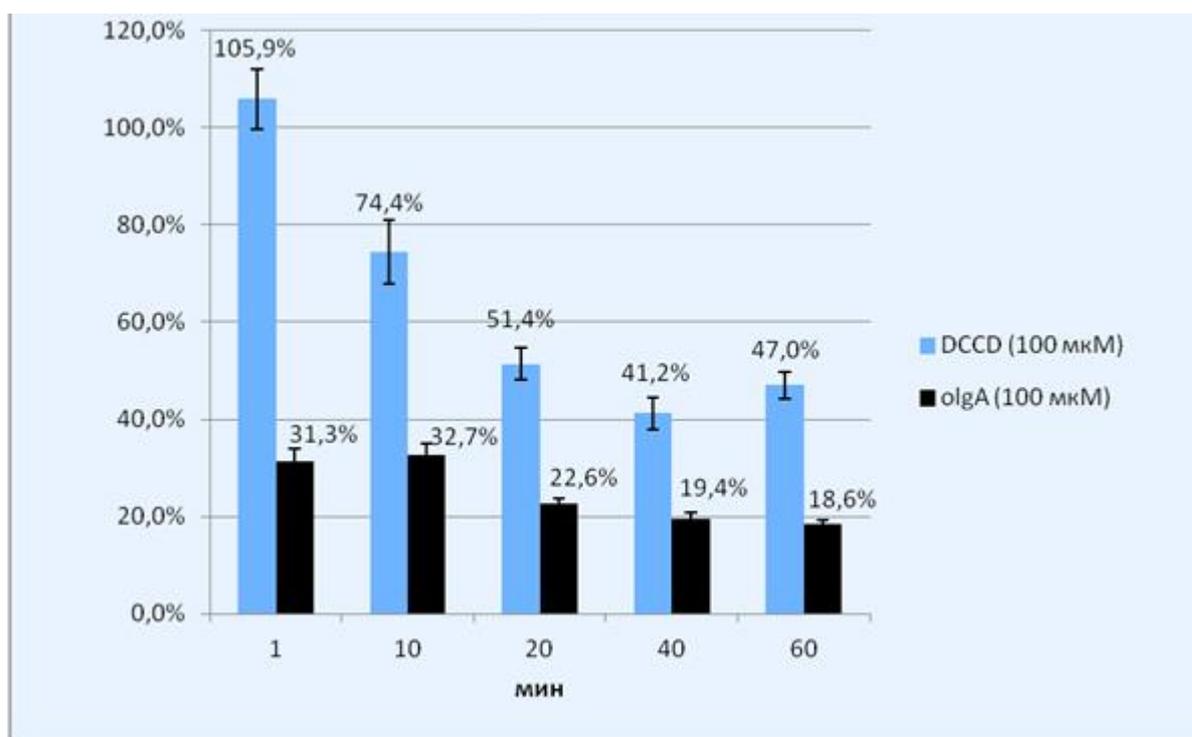


Рисунок 7.3. Степень ингибирования АТФ-синтазной активности FoF1-АТФ-синтазы в препаратах инвертированных мембранных везикул *S. fradiae*, предобработанных дициклогексилкарбодиимидом (DCCD, 100 мкМ) и олигомицином А (olgA, 100 мкМ).

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

7.5. Определение уровня чувствительности (устойчивости) к новым производным олигомицина А на линии культур клеток

Изучены уровни устойчивости производных олигомицина А в отношении линии клеток хронической миелоидной лейкемии К-562, а также линии клеток карциномы кишечника человека НСТ-116 (Таблица 7.4). Результаты, полученные в этом эксперименте, подтвердили важную роль 33-гидроксигруппы боковой цепи олигомицина А в его биологических свойствах. Полученные данные говорят о

том, что добавление мезильной группы по 33 положению повышает селективное действие олигомицина А в отношении опухолевых клеток. При этом у нитрон-олигомицина и 33-Дезокси-33-(S)-азидоолигомицин А уровень цитотоксичности почти не изменился относительно олигомицина А.

Таблица 7.4. Определение уровня цитотоксичности новых производных олигомицина А на эукариотических клетках.

Соединение	Эукариотические (раковые) клетки, IC ₅₀ , мкМ	
	HCT116	K562
Олигомицин А	1,0±0,2	0,2±0,01
нитрон-олигомицин, (Olg1)	1,4±0,2	0,7±0,2
33-Дезокси-33-(S)-азидоолигомицин А (Olg 2)	1,0±0,3	0,1±0,03
33-о-мезильное производное олигомицина А (Olg 3)	6,4±0,9	5,8±2,1

7.6. Полногеномное секвенирование генома *S. fradiae* ATCC 19609

Для анализа резистома (совокупность генов, отвечающих за возникновение устойчивости к антибиотикам) [Wright, 2007] было проведено полногеномное секвенирование данного штамма. Секвенирование генома проводилось методом полногеномного секвенирования с использованием системы Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). В общей сложности получено 362,184 прочтений. Все прочтения были собраны в первоначальный геном длиной 7,670,374 нуклеотидов с 21-кратным покрытием с использованием GS de novo assembler version 3.0 (Roche). Результатами полногеномного секвенирования стало получение 171 контигов (155 контигов >500 п.н., самый длинный контиг – 362,888, GC состав 72,83%). Автоматическая аннотация генома проводилась с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok). Геном *S. fradiae* nitR⁺bld

содержал 6,363 предсказанных генов, 3 рРНК и 63 тРНК. Всего было обнаружено 6,179 кодирующих последовательностей, 113 псевдогенов, 5 некодирующих РНК, 11 CRISPs и 79 генов с мутацией в рамке считывания. Также дополнительно были обнаружены 7 элементов (IS), и только один регион фаговой активности (PHAST) [Zhou et al., 2011]. Геном был депонирован (JNAD00000000) [Bekker et al., 2014].

Анализ генома выявил гены, которые могут быть вовлечены в процесс возникновения устойчивости: 9 генов множественной лекарственной устойчивости (multidrug ABC transporter ATP-binding proteins), 4 транскрипционных регулятора семейства WhiB, 10 генов системы токсин антитоксин, 28 - серин-треониновых протеинкиназ, 8 аминогликозидфосфотрансфераз, 2 отрицин N-ацетилтрансферазы, 2 β -лактамазы, 2 глиоксалазы, гены устойчивости к блеомицину, пуромицин N-T ацетилтрансферазы, стрептомицин 6-фосфотрансферазы, гены устойчивости к хлорамфениколу, тетраценомицину C и гены отвечающие за его выброс из клетки, гены транспорта бацитрацина (ATP-binding protein BcrA), и гены транспорта макролидных антибиотиков (ATP-binding/permease protein MacB-2). Фермент FoF1-АТФ-синтаза *S. fradiae* ATCC 19609 состоит из 9 субъединиц. Возможно, эти гены ответственны за механизмы возникновения устойчивости и сверхчувствительности у бактерий.

7.7. Аннотация генов устойчивости к антибиотикам в геноме *S. fradiae* ATCC 19609 и выявление их ортологов в геноме *S. lividans* TK24 и *S. albus* J1074

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 токсинов/антитоксинов, функционирование которых в стрессовых условиях переводит клетки в персистирующее состояние, что приводит к их толерантности к антибиотикам.

На данном этапе исследований для выявления возможной природы сверхчувствительности *S. fradiae* ATCC 19609 к антибиотикам было проведено сравнение генов MDR-транспортеров и семейства транскрипционных регуляторов WhiB, принимающих участие в осуществлении природной устойчивости у *S. fradiae* ATCC 19609, *S. albus* J1074 и модельного объекта *S. lividans* TK24.

В Таблице 7.5 отражены данные сравнения аминокислотных последовательностей трех групп генов: генов транспорта различных классов антибиотиков и генов семейства транскрипционных регуляторов WhiB *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* (устойчивость к хлорамфениколу), *macB* (устойчивость к макролидным антибиотикам) и *drxA*, *drxB* (устойчивость к даунорубицину) 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 даунорубицин устойчивого белка (DrrC, 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 [Tocci et al., 2013]; транспортера семейства MFS, способствующего устойчивости к бромистому этидию и гигромицину В [Dumina et al., 2013]; а также ген пурамицин-устойчивого белка семейства EmrB/QacA и ген двусубъединичного MDR-ABC транспортера, гомологичного гену белка Pgp человека по всей длине гена с 54%

подобия. Гомология аминокислотных последовательностей белков 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* [Vatlin et al., 2016]. Также в геноме *S. fradiae* были обнаружены транскрипционные регуляторы, которые могут быть вовлечены в процесс формирования устойчивости у бактерий – *whiB*, *padR*, *marR*, *lfrR*, *tetR*.

Таблица 7.5. Сравнительный анализ наличия и процента идентичности (выравнивание аминокислотных последовательностей) некоторых генов природной устойчивости к антибиотикам *S. lividans* ТК24, *S. fradiae* ATCC 19609 и *S. albus* J1074

<i>S. lividans</i> ТК24	<i>S. fradiae</i> ATCC 19609	<i>S. albus</i> J1074
Название и номер в базе данных Genbank, ссылка на статью	Наличие и идентичность (%) аминокислотной последовательности	
Гены устойчивости к антибиотикам различных хим. классов		
металло-β-лактамаза (AIJ16205.1)	отсутствует	30%
Ген устойчивости к хлорамфениколу cmIR (AIJ11231.1) [Dittrich et al., 1991]	42%	51%
Ген устойчивости к макролидным антибиотикам MacB (AIJ17651.1) [Tikhonova et al., 2007]	56%	63%

Ген устойчивости к тетрациклину TetM (AIJ17686.1)	отсутствует	47%
Ген устойчивости к даунорубицину DrrA (AIJ14779.1)	53%	81%
Ген устойчивости к даунорубицину DrrB (AIJ14778.1)	32%	77%
Ген устойчивости к даунорубицину DrrC (AIJ12183.1)	84%	84%
Ген устойчивости к блеомицину (WP_003974753.1)	90%	33%
Ген устойчивости к бицикломицину (WP_003971599.1)	отсутствует	27%
Транспорт различных классов антибиотиков		
MFS – транспортер (AIJ13179.1)	36%	53%
MFS – транспортер (AIJ11465.1)	отсутствует	55%
MFS – транспортер (AIJ18016.1)	26%	26%
MFS – транспортер (AIJ15268.1)	74%	76%
MDR ABC-транспортер (AIJ11864.1)	52%	80%

MDR-транспортер семейства MatE (AIJ14696.1)	82%	82%
ABC-транспортер (AIJ11864.1)	52%	80%
MDR ABC-транспортер (AIJ15693.1)	75%	81%
Транскрипционные регуляторы		
whiB (AIJ13619.1)	82%	81%
whiB (AIJ15023.1)	88 %	87%
padR (WP_003973705.1)	58%	70%
marR (AIJ17977.1)	70%	36%
tetR (WP_003978637.1)	отсутствует	24%
lfrR (AIJ16876.1)	40%	65%

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.

7.8. Получение мутантов штамма *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к производным олигомицина А

Антибиотики класса олигомицинов являются цитотоксическими макролидами, содержащими 26-членный α , β -ненасыщенный лактон, конденсированный с бициклической спирокетальной кольцевой системой. Олигомицин А является высокоспецифичным ингибитором окислительного фосфорилирования в митохондриях эукариот, что приводит к остановке процесса синтеза АТФ [Symersky et al., 2012]. *S. fradiae* ATCC 19609 является сверхчувствительным к олигомицину А (<0,001 нмоль/мл или 0,0005 нмоль/диск) [Alekseeva et al., 2009] и его производным.

Попытки получить мутантную бактерию *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивую к олигомицину А проводились в этой работе и были безуспешны. Поэтому было высказано предположение о наличии нескольких биомишеней действия олигомицина А у *S. fradiae* ATCC 19609. Было высказано предположение, что полученные новосинтезированные производные олигомицина А будут действовать на одну биомишень, отличную от АТФ-синтазы. Располагая серией полусинтетических производных олигомицина А, характеризующихся различной эффективностью на *S. fradiae* ATCC 19609, в настоящей работе мы получили мутанты, устойчивые к некоторым из них:

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

В результате селекции был получен мутант, устойчивый к производному нитрон-олигомицину – OlgR1, 8 мутантов, устойчивых к производному олигомицину А - (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину – Olg4R. Частота получения мутантов указана в Таблице 7.6.

Таблица 7.6. Частота получения мутантов устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к производным олигомицина А.

Производное олигомицина А	Частота возникновения мутантов	Доза антибиотика, при которой отобрали мутант, нм/мл	МИК исходного штамма, нм/диск
Нитрон-олигомицин (Olg1)	1:2*10 ⁹	150	10
(33S)-33-дезокси-33-тиоцианатоолигомицин А (Olg 4)	1: 6*10 ⁸	70	1

Для выявления единичных нуклеотидных замен (SNP) на гены, которые могут быть вовлечены в транспорт антибиотика из клетки, найденные в процессе биоинформатического анализа были подобраны праймеры (см. Материалы и методы) и проведена амплификация генов из геномов мутантных штаммов *S. fradiae*, после чего проведено их секвенирование по Сенгеру. Это было необходимо для исключения наличия мутаций в генах ответственных за выброс антибиотика из клетки и исключения из дальнейшего анализа части мутантных штаммов. В результате анализа полученных последовательностей генов SNP в исследованных генах обнаружены не были. На основании этих данных мы смогли установить что устойчивость возникает из-за неизвестного ранее механизма, а не из-за известных механизмов, таких как выброс антибиотика из клетки или действие веществ на известные биомишени.

7.8.1. Получение и характеристика *tcnR*⁺ мутанта устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину у *S. fradiae* ATCC 19609

Отбор спонтанных *tcnR*⁺ мутантов *S. fradiae* осуществляли как описано в разделе материалы и методы путем высева на агаризованную среду содержащую антибиотик. Частота возникновения мутантов составляла 1: $6 \cdot 10^8$. При проведении фенотипического анализа было выявлено, что фенотип – спорулирующий, скорость роста нормальная. Всего было получено 8 мутантных штаммов. 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 олигомицину А и его производным (Таблица 7.7).

Таблица 7.7. Сравнение уровня устойчивости штаммов *S. fradiae* ATCC 19609 и *S. fradiae* ATCC 19609- *tcnR*⁺ к производным олигомицина А, (использован метод дисков).

Антибиотик	Концентрация, нм/диск	Зона ингибирования, мм	
		<i>S. fradiae</i> ATCC 19609, мм.	<i>S. fradiae</i> ATCC 19609- <i>tcnR</i> ⁺ , мм
Олигомицин А	0,01	12.0±1.0*	9.0±1.0*
(33S)-33-Дезокси-33- тиоцианатоолигомицин (Olg4)	50	14.0±1.0	0
Нитрон-олигомицин (Olg1)	120	14.0±1.0	10.0±1.0
33-Дезокси-33-(S)- азидоолигомицин А (Olg2)	10	16.0±0.5	10.0±1.0
33-О-Мезил олигомицин (Olg3)	10	16.0±1.0	9.0±1.0

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

7.8.2. Получение и характеристика nitR⁺ мутанта, устойчивого к нитрон-олигомицину А, *S. fradiae* ATCC 19609

Отбор спонтанных nitR мутантов *S. fradiae* осуществляли как описано в разделе материалы и методы путем высева на агаризованную среду содержащую антибиотик. Частота возникновения мутантов составляла $1:2 \cdot 10^9$.

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 [Chater et al., 1989; Elliot et al., 2001; Yu et al., 1995].

В процессе исследования устойчивости полученного мутанта к олигомицину А и некоторым его производным установлено, что чувствительность *S. fradiae*-nitR⁺bld к олигомицину А не изменилась, но он приобрел более высокий уровень устойчивости к производным олигомицина А (Таблица 7.8).

Таблица 7.8. Спектр устойчивости мутанта *S. fradiae*-nitR⁺bld к олигомицину А и его производным, полученный методом дисков.

Антибиотик	Концентрация, нм/мл	Зона ингибирования, мм	
		<i>S. fradiae</i> ATCC 19609	<i>S. fradiae</i> -nitR ⁺ bld
Олигомицин А	0,01	12.0±1.0*	12.0±1.0*
Нитрон-олигомицин (Olg1)	120	13.0±1.0	0

33-Дезокси-33-(S)-азидоолигомицин А (Olg 2)	10	16.0±1.0	13.0±1.0
33-О-мезилоолигомицин (Olg3)	10	17.0±1.0	12.0±1.0

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

7.9. Полногеномное секвенирование мутанта, устойчивого к (33S)-33-дезокси-33-тиоцианатоолигомицину *S. fradiae* tcnR+

Для поиска изменений в геноме штамма *S. fradiae* tcnR+, которые привели к возникновению устойчивости, проведено полногеномное секвенирование на платформе системы Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland).

Всего было сгенерировано 273,750 прочтений, которые собраны в последовательность длиной 7,621,490 нуклеотидов с 17-кратным покрытием с использованием программы GS de novo assembler version 3.0 (Roche). Результаты: нуклеотидные последовательности собраны в 464 контигов (401 контигов >500 п.н., самый длинный контиг – 164,913, GC состав 72,8%). Автоматическая аннотация генома проводилась с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok). Геном мутантного штамма *S. fradiae*, устойчивого к (33S)-33-дезокси-33-тиоцианатоолигомицину содержал 6,482 предсказанных генов, 3 рРНК и 63 тРНК. Обнаружено 5,865 кодирующих последовательностей, 548 псевдогенов, 3 некодирующих РНК и 4 CRISPs. Геном был депонирован NCBI (MCNU00000000). Для выявления ряда SNP, мутация в которых могла бы приводить к возникновению устойчивости мутантного штамма к (33S)-33-дезокси-33-тиоцианатоолигомицину, был проведен биоинформатический анализ, включающий в себя выравнивание генома мутантного штамма на геном штамма дикого типа с помощью программы GS reference mapper (Roche).

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.

7.10. Изучение функции гена хеликазы у мутантного штамма *S. fradiae* tcnR⁺

Было проведено полногеномное секвенирование геномов двух мутантных штаммов, устойчивых к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину. Обнаружены единичные нуклеотидные замены в различных участках генома. В первую очередь отобраны несинонимичные нуклеотидные замены, затем отобраны те мутации, которые находились в кодирующих участках генома. Идентичная мутация в гене хеликазы была найдена в геномах обоих мутантных штаммов. Наличие этой единичной нуклеотидной замены в геномах остальных шести мутантных штаммах было подтверждено с помощью секвенирования по Сенгеру. Таким образом в штамме *S. fradiae* tcnR⁺ выявлена единичная нуклеотидная замена С(1797)Т в гене хеликазы (KDS85476.1) NCBI, которая привела к замене аминокислоты А(600)Т в регионе P-loop NTPase (Рисунок 7.4.) (см Приложение). Данная мутация, возможно, привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину.

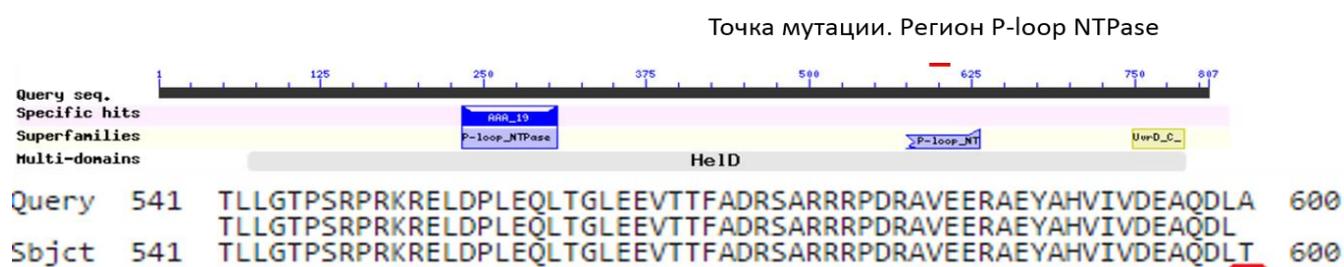


Рисунок 7.4. Мутация в гене хеликазы IV (KDS85476.1) штамма *S. fradiae* tcnR⁺ привела к замене А(600)Т в консервативном регионе P-loop NTPase.

7.10.1. Биоинформатический анализ гена хеликазы штамма *S. fradiae* ATCC 19609

Данная хеликаза по существующей классификации относится к IV классу ДНК-хеликаз, функции которых заключаются в участии в репликации, рекомбинации и репарации ДНК различных бактерий [Chène, 2008; Gwynn et al., 2013; Hwang et al., 2012]. Аминокислотные последовательности хеликаз IV гомологичны у актинобактерий по всей длине гена с % подобия от 43 до 94 (Таблица 7.9.). Область, в которой произошла мутация, высоко консервативна у всех членов рода *Streptomyces*.

Таблица 7.9. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей хеликазы *S. fradiae* ATCC 19609 (KDS85476.1) и гомологичных белков семейства стрептомицетов, а также хеликаз других видов бактерий, представленных в базе данных NCBI.

Название м/о	Номер аминокислотной последовательности в базе данных и название белка	Гомология хеликаз, а/а		
		Идентичность, %	Подобие, %	Длина гомологичной области, аа
<i>Streptomyces albus</i>	ref WP_030549241.1 DNA helicase IV	94	94	1-814
<i>Streptomyces rimosus</i>	WP_032918872.1 DNA helicase IV	79	86	1-789
<i>Streptomyces griseus</i>	ref WP_030701601.1 DNA helicase IV	78	84	1-793
<i>Streptomyces avermitilis</i>	ref WP_010986530.1 DNA helicase IV	75	82	22-836
<i>Streptomyces</i>	ref WP_011028678.1	76	82	18-807

<i>coelicolor</i>	DNA helicase IV			
<i>Frankia sp.</i> CN3	WP_035924291.1 DNA helicase IV	34	44	1-781
<i>Frankia sp.</i> BCU110501	ATPase AAA DNA helicase IV	30	43	19-791
<i>Frankia sp.</i> EI5c	gb OAA26065.1 DNA/RNA helicase, superfamily I	34	44	3-652
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	emb CNF55254.1 DNA/RNA helicase superfamily I	39	50	15-829
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ref WP_011728199.1 DNA helicase IV	33	44	15-795
<i>Bacillus sp.</i> FJAT-28004	ref WP_054028869.1 DNA helicase IV (UvrD)	26	40	127-789
<i>Streptococcus pneumonia</i>	emb CVN93872.1 helicase IV	34	44	10-804

Область, в которой произошла мутация, высоко консервативна у всех членов рода *Streptomyces* (Рисунок 7.5.).

	BAD	AVG	GOOD
<i>S. fradiae</i> ATCC19609	MAA	RPDRAVEERA-EYAHVIVDEAQDL	APMQWRMVGRRGRHATWTVVGDPAQSSWSDP
<i>S. fradiae</i> <i>tcn</i> ⁺	MAA	RPDRAVEERA-EYAHVIVDEAQDL	APMQWRMVGRRGRHATWTVVGDPAQSSWSDP
<i>S. albus</i>	MAA	RPERAVEERT-EYAHVIVDEAQDL	APMQWRMVGRRGRHATWTVVGDPAQSSWSAP
<i>S. griseus</i>	MAA	RAERLAAERT-EYAHVIVDEAQDL	APMQWRMVGRRGRHATWTVVGDPAQSSWSDP
<i>S. kanamyceticus</i>	MLI	RAERLAQERT-EYAHVIVDEAQDL	APMQWRMVGRRGRHATWTVVGDPAQSSWSDP
<i>S. niger</i>	MA-	RRERLAEERT-DYAHVIVDEAQDL	APMQWRMVGRRGRHATWTVVGDPAQSSWSDP
<i>Frankia</i> sp. CN3	MS-	TAERAAADRTWAYGHVIVDEAQEL	SHMAWRMVRRCPRSMTLVGDVAQTGDLAG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MSS	VDDGVVEERP-EYAHVIVDEAQDL	APMQWRMLGRRGRQASWTIVEDPAQSAWEDL
<i>Bacillus</i> sp.FJAT-28004	MTV	-----KQ-FFDHIVIDEAQDYS	PFQLEVLRLCQRTASMTVLGDLQQGIHAYA
cons	*	:	: *::****: : : : *:: * *

Рисунок 7.5. Выравнивание аминокислотных последовательностей хеликазы исследуемого *S. fradiae tcnR*⁺ (KDS85476.1), и хеликаз других видов бактерий, аннотированных в базе данных NCBI и имеющих наибольшую гомологию исследуемого региона P-loop_{NTPase}. Аминокислотная замена, которая привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину у мутантного штамма A(600)T выделена красным. Выполнено в программе T-COFFEE, Version_11.00.d625267.

При этом у большинства стрептомицетов в этой точке аминокислотной последовательности хеликазы находится остаток треонина, в отличие от штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609, где присутствует остаток аланина. Метильная группа аланина является неактивной и таким образом, почти никогда непосредственно не участвует в функции белка [Prabha et al., 2010]. Известно, что мутации в ДНК-хеликазе IV приводит к снижению ее активности, ингибируя активность ДНК-специфичных экзонуклеаз, участвующих в гомологической рекомбинации и репарации ДНК [Lovett et al., 1995]. Мы предполагаем, что аминокислотная замена (A(600)T) нефункционального аланина на функциональный треонин привела к восстановлению функции хеликазы и возникновению устойчивости мутантного штамма к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину.

7.11. Полногеномное секвенирование мутанта, устойчивого к нитро-олигомицину *S. fradiae-nitR⁺bld*

Секвенирование генома проводилось с использованием метода полногеномного секвенирования на платформе системы Roche 454-GS Junior instrument (Roche, Switzerland). В общей сложности было получено 344,794 прочтений. Все прочтения были собраны в первоначальный геном длиной 7,667,096 нуклеотидов с 21-кратным покрытием с использованием GS de novo assembler version 3.0 (Roche).

Результатами полногеномного секвенирования стало получение 208 контигов (198 контигов >500 п.н., самый длинный контиг – 316,524, GC состав 72,8%). Автоматическая аннотация генома проводилась с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok). Геном *S. fradiae-nitR⁺bld* содержал 6,474 предсказанных генов, 4 рРНК и 65 тРНК. Всего было обнаружено 5,781 кодирующих последовательностей, 617 псевдогенов, 7 некодирующих РНК, 4 CRISPs и 77 генов с мутацией в рамке считывания. Также дополнительно были обнаружены 10 мобильных генетических элементов (IS), и только один регион фаговой активности (PHAST) [Zhou et al., 2011]. Геном был депонирован (LGSP01000001) [Vatlin et al., 2015]. Поиск SNP был проведен с помощью биоинформатического анализа, включающего в себя выравнивание генома мутантного штамма на геном штамма дикого типа с помощью программы GS reference mapper (Roche).

Для идентификации мутации приведшей к nitR⁺bld фенотипу осуществлено полногеномное секвенирование ДНК *S. fradiae-nitR⁺bld* с целью поиска нуклеотидных замен в геноме (SNP), приведших к устойчивости.

При проведении сравнительного биоинформатического анализа для поиска единичных нуклеотидных замен геномов мутантного штамма и штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609 были обнаружены единичные нуклеотидные замены в

различных участках генома. В первую очередь отобраны несинонимичные нуклеотидные замены, затем отобраны те мутации, которые находились в кодирующих участках генома. Идентифицирована мутация в многофункциональном гене *padR*, который у различных бактерий может быть вовлечен в контроль экспрессии генов, связанных с детоксикацией, вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью у бактерий [Fibriansah et al., 2012; Florez et al., 2015; Heravi et al., 2015].

Данная мутация была дополнительно подтверждена секвенированием по Сенгеру. В результате была подтверждена SNP, приводящая к замене аминокислоты Н(24)R в ДНК-связывающем консервативном районе, входящем в суперсемейство НТН в белке полифункционального транскрипционного регулятора двойного действия PadR (KDS89815.1).

7.12. Характеристика мутантного штамма *S. fradiae-nitR⁺bld*. Протеомный и транскрипционный анализ

В настоящей работе получен мутантный штамм *S. fradiae-nitR⁺bld*, устойчивый к нитрон-олигомицину, проведена его фенотипическая, генотипическая характеристика, транскрипционный анализ генов, отвечающих за *nitR⁺* и *bald* фенотип («голый» почти не образующий воздушного мицелия, слабоспорулирующий). Сравнительный геномный анализ ДНК мутантного штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* и ДНК штамма дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609 позволил выявить мутацию А(71)G в гене *padR* (KDS89815.1) – полифункциональном транскрипционном регуляторе двойного действия.

Мутация привела к аминокислотной замене Н(24)R в ДНК-связывающем консервативном районе, входящем в суперсемейство НТН, характерном для всех бактерий семейства *Streptomyces* (Helix-turn-helix domains, interval 19-81 a.a.) (см Приложение). (Рисунок 7.6.).

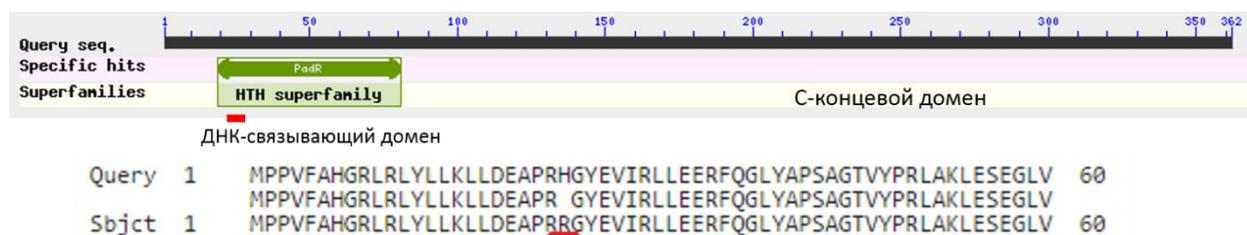


Рисунок 7.6. Мутация в гене *padR* у штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* привела к замене Н(24)R в ДНК-связывающем консервативном районе, входящем в суперсемейство НТН.

По литературным данным [Fibriansah et al., 2012; Florez et al., 2015; Heravi et al., 2015; Huillet et al., 2006; Kaval et al., 2015; Thi et al., 2011] белки семейства PadR образуют большую и распространенную группу бактериальных транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию генов, участвующих в процессе детоксификации, вирулентности и множественной лекарственной устойчивости бактерий. Данное семейство названо в честь репрессора декарбоксилирования фенольных кислот (phenolic acid decarboxylation repressor), который может быть вовлечен в негативную регуляцию множества генов в грамположительных бактериях [Fibriansah et al., 2012]. Кроме того было показано, что некоторые белки семейства PadR могут вызывать как негативную так и позитивную регуляцию других генов [Florez et al., 2015].

7.12.1. Распространение и функции гена *padR* у Грам+ бактерий

При проведении дальнейшего анализа полученной SNP и генетической характеристики гена *padR* было установлено, что гены данного семейства присутствуют у большинства бактерий [Fibriansah et al., 2012; Florez et al., 2015; Heravi et al., 2015; Huillet et al., 2006; Kaval et al., 2015; Thi et al., 2011] (Таблица 7.10). У представителей семейства *Streptomyces* ген *padR*, в котором был найден SNP, имеет высокую степень гомологии по всей длине, при этом идентичность ДНК- связывающего домена составляет около 98%.

Таблица 7.10. Сравнительный биоинформатический анализ последовательностей белка семейства PadR *S. fradiae* ATCC 19609 и некоторых представителей рода *Streptomyces*.

Название микроорганизма	Номер белка	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. AGP55061.1	60%	98%
<i>S. himastatinicus</i>	EFL23306.1	62%	98%
<i>S. bingchengensis</i>	ADI07041.1	64%	98%
<i>S. avermitilis</i>	BAC70688.1	61%	98%
<i>S. rimosus</i>	WP_033033521.1	59%	98%

При поиске генов, гипотетически регулируемых PadR в геноме *S. fradiae* ATCC 19609, нами был обнаружен предполагаемый сайт-связывания белка PadR. Эта область гомологична области сайта связывания белка-регулятора VanR *Corynebacterium glutamicum*, который относится к семейству PadR-like family transcriptional regulator. Сайт связывания VanR *C. glutamicum* состоит из инвертированных повторов (ААСТААСТАА(N4)ТТАGGТАТТТ) [Heravi et al., 2015]. Предполагаемый сайт связывания белка PadR *S. fradiae* находится на расстоянии в 13 п.н. от стартового кодона гена *marR*-family transcriptional regulator (KNE81702.1) и имеет гомологию 70% ранее известному сайту связывания белка VanR (Рисунок 7.7.).

```

bp                               -34                               0
marR                             agatacctaactcaggtatgcaaaaggagggtgtcatg
VanR binding site               ААСТААСТААНТТАGGТАТТТ-----
*   * * * * * * * * * * * * * * *

```

Рисунок 7.7. Предполагаемый сайт связывания PadR *S. fradiae*.

Белок MarR (multiple antibiotic resistance regulator) вовлечен во множество процессов у *Streptomyces* и является глобальным регулятором. 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 споруляцию и развитие воздушного мицелия. Они, как правило, действуют как репрессоры транскрипции, хотя иногда могут выступать в качестве активаторов или иметь двойной механизм - репрессии и активации [Healy et al., 2016; Roy et al., 2016; Zhang et al., 2015] .

7.12.2. Сравнительный протеомный анализ мутантног штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* и исходного штамма *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 везикул штамма дикого типа и штамма *S. fradiae-nitR⁺bld*.

При проведении масс-спектрометрического анализа белковых фракций везикул 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 (Рисунок 7.8., Таблица 7.11) [Salerno et al., 2013]. Эти данные указывают, что устойчивость *S. fradiae-nitR⁺bld* обусловлена работой транспортеров (WP_043466588.1, WP_043465859.1).

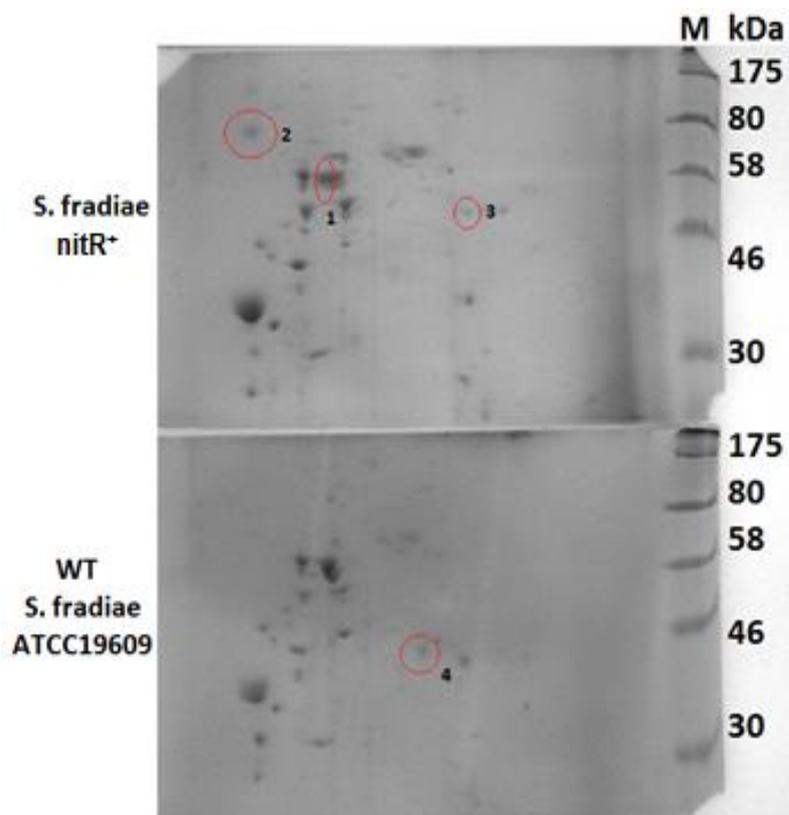


Рисунок 7.8. Электрофореграмма белкового спектра мутанта *S. fradiae-nitR⁺bld* и штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Выявлено качественное изменение следующих белков: у штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* обнаружено появление белков - alkaline phosphatase, leucyl aminopeptidase (**1**), phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS (**2**), peptide ABC transporter substrate-binding protein (**3**) и исчезновение белка alanine dehydrogenase (**4**) (Таблица 7.9)

Таблица 7.11. Спектр количественных изменений белков и их характеристика у мутанта *S. fradiae-nitR⁺bld* и *S. fradiae* ATCC 19609.

Номер белка в GenBank, обозначение гена	Молекулярная масса (kDa)	Аннотация белка	Предполагаемая функция	Присутствие в штамме <i>S. fradiae</i>	
				ATCC 19609	nitR ⁺ bld
WP_043466588.1P stS	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_043468956.1a Alkaline phosphatase D	57,761	Alkaline phosphatase	Транспорт неорганических ионов и метаболизм	-	+
WP_043470568.1a aminopeptidase A	51,676	Leucyl aminopeptidase	Делеция у <i>S. coelicolor</i> привела к повышенной споруляции – повышенная экспрессия может приводить к bald фенотипу. [Song et al., 2013]	-	+
WP_043468956.1 Ald	39,366	Alanine dehydrogenase	Вовлечен в процесс спорообразования	+	-

7.12.3 Изучение уровня экспрессии генов, ответственных за nitR и bald фенотип, у мутантного штамма *S. fradiae*-nitR⁺bld и исходного штамма *S. fradiae* ATCC 19609 методом ПЦР в реальном времени

Белки alkaline phosphatase и alanine dehydrogenase на электрофореграмме находятся в одной белковой фракции соответственно. Возникает вопрос: какой именно из двух генов мутантного штамма обладает повышенным уровнем экспрессии? Было проведено исследование экспрессии этих генов методом ПЦР в реальном времени. Для определения количественного изменения уровня транскрипции 2 генов ABC транспортеров (WP_043466588.1, WP_043465859.1), было проведено измерения их уровня транскрипции 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 мутантного штамма. 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 7.9.).

Это подтверждает предположение, что ген *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.

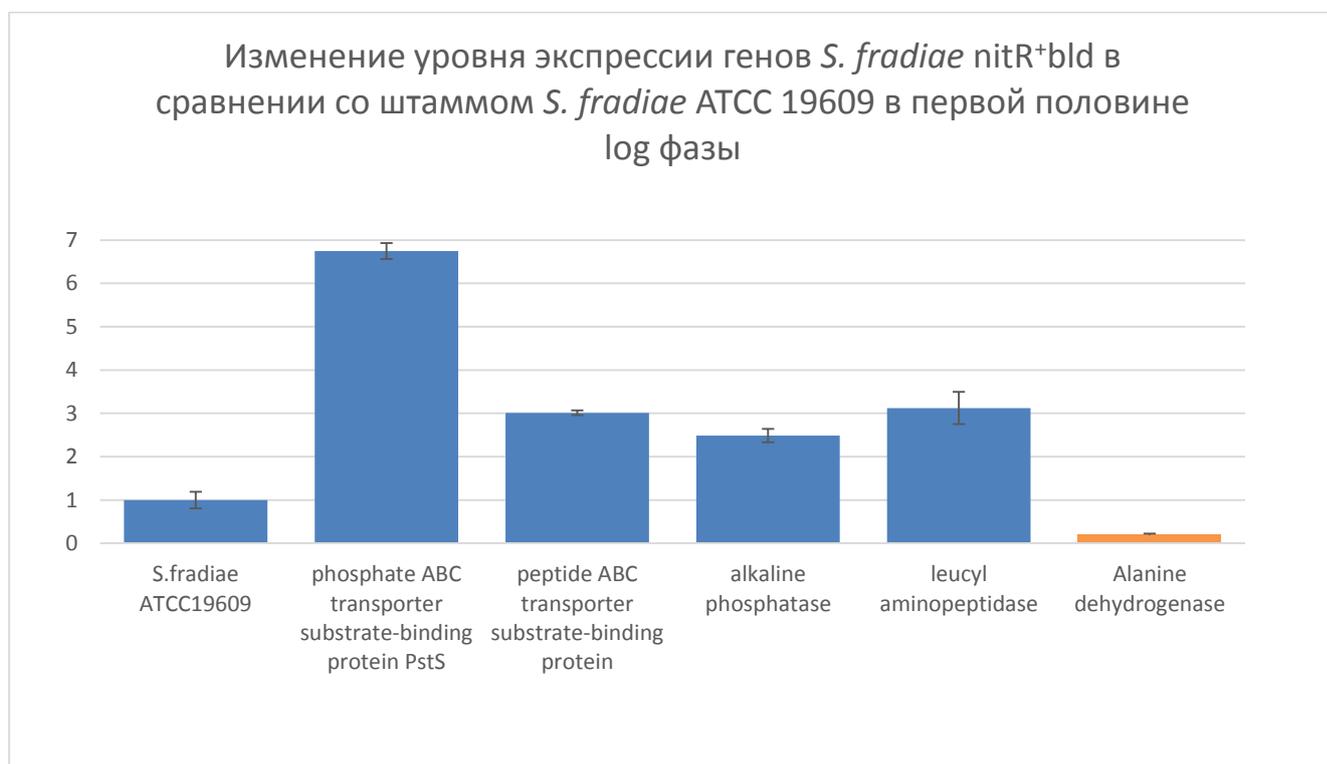


Рисунок 7.9. Относительная экспрессия генов *S. fradiae-nitR⁺bld* по сравнению со штаммом *S. fradiae* ATCC 19609 была рассчитана с использованием сравнительного метода Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), принимая экспрессию генов в *S. fradiae* ATCC 19609 в качестве контроля (экспрессия штамма дикого типа 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 было выявлено слабое спорулирование 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 [Bush et al., 2016]. При проведении сравнения экспрессии генов *whiB* мутантного штамма и штамма дикого типа – выявлен сниженный в 2,5 раза уровень экспрессии гена штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* (Рисунок 7.10.). На основании этих данных можно также предположить наличие связи между регулятором PadR и геном *whiB*.



Рисунок 7.10. Изменение экспрессии гена *whiB* штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* относительно штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Уровень экспрессии гена *whiB* измерялся в начале log-фазы.

7.12.4. Изучение уровня экспрессии гена *marR* *S. fradiae-nitR⁺bld* и *S. fradiae* ATCC 19609 при индукции нитрон-олигомицином

Для проверки предположения о регуляции белком PadR гена *marR* нами была проведена индукция микроорганизмов штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* и штамма дикого типа субингибирующими концентрациями нитрон-олигомицина. 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 количестве 50

нм/мл) мы наблюдали значимое изменение экспрессии гена *marR* (3-кратное увеличение в первый час после индукции и 4,5 кратное увеличение во второй час после индукции) в то время как у неиндуцированного штамма дикого типа экспрессия гена *marR* не изменялась (Рисунок 7.11.). При индукции нитрон-олигомицином штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* мы не наблюдали изменения экспрессии гена *marR* (Рисунок 7.12.). На основании полученных данных мы предполагаем наличие связи между регуляторным белком PadR и геном *marR*.

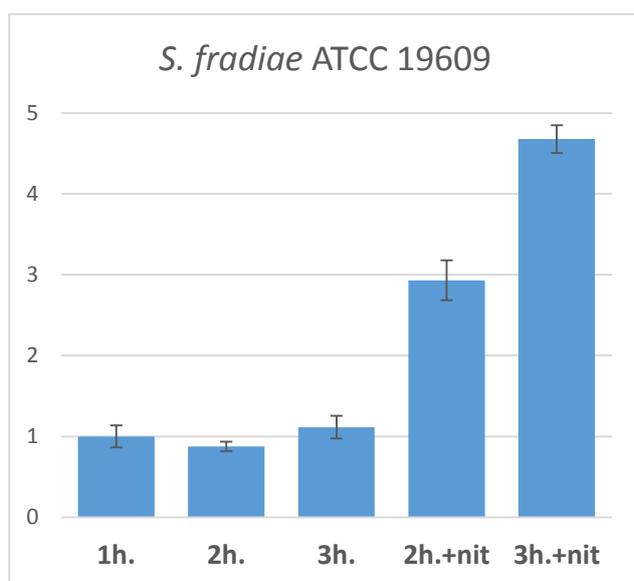


Рисунок 7.11. Изменение экспрессии гена *marR* *S. fradiae* ATCC 19609 при индукции его нитрон-олигомицином А. Индукция штамма проводилась в log фазе.

1h. – нулевая точка, до начала индукции.

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

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

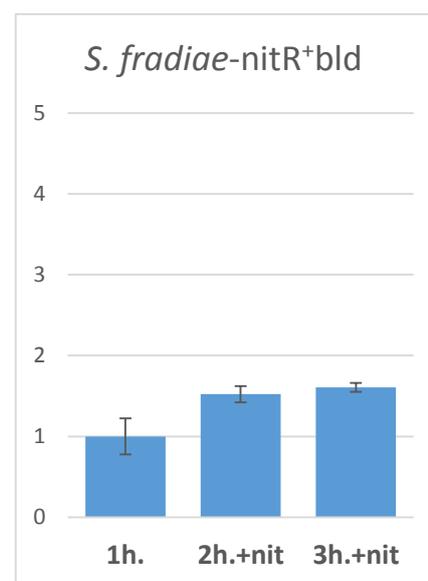


Рисунок 7.12. Изменение экспрессии гена *marR* *S. fradiae-nitR⁺bld* при индукции его нитрон-олигомицином. Индукция штамма проводилась в log фазе.

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).

7.12.5. Предполагаемая схема участия транскрипционного регулятора PadR в регуляции других генов у *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 транскрипционный фактор *bdtA*.

У стрептомицетов семейство генов *whi*, играет важную роль в формировании зрелых спор. Изучение генной сети при формировании спор выявило как минимум два сигма фактора (*whiG* и *sigF*) и ряд транскрипционных факторов. Также существует отдельная группа генов, ответственная за формирование воздушного мицелия – гены *bld*, мутация в которых приводит к возникновению *bald* фенотипа. Гены, относящиеся к *bld* кодируют разнообразные продукты, в том числе тРНК, АТФ-binding cassette (ABC) membrane-spanning transporter, сигма фактор и unrelated anti-anti-sigma factor, а также факторы транскрипции, *bldD* и *bldM*. Также гены *bld* могут быть вовлечены в процессы производства антибиотика, поглощение углерода, что указывает на глобальную регуляторную роль данного класса. [Elliot et al., 2001]

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 у гена *whiB*.

На основании полученных нами данных можно предположить, что белок PadR является глобальным 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 мембранного транспортера, выбрасывающего из клетки нитрон-олигомицин, чем и может быть обусловлена устойчивость мутантного штамма к нитрон-олигомицину. По результатам, полученным в данной работе можно предположить, что экспрессия гена *whiB*, отвечающего за морфогенез, регулируется либо белком PadR, либо какими-либо другими транскрипционными факторами, потому что при индукции нитрон-олигомицином уровень экспрессии гена *whiB* штамма *S. fradiae-nitR⁺bld* был почти в три раза ниже, чем у штамма дикого типа. Очевидно, что мутация в гене *padR* приводит к формированию bald phenotype, и что данный белок играет важную функцию в нормальном развитии мицелия и спорообразования. Существует мнение, что ген alanine dehydrogenase является одним из множества генов, который вовлечен в процесс спорообразования и возможно регулируется транскрипционным регулятором WhiA (относящийся к семейству *bld* транскрипционных регуляторов). Было показано, что у 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.)

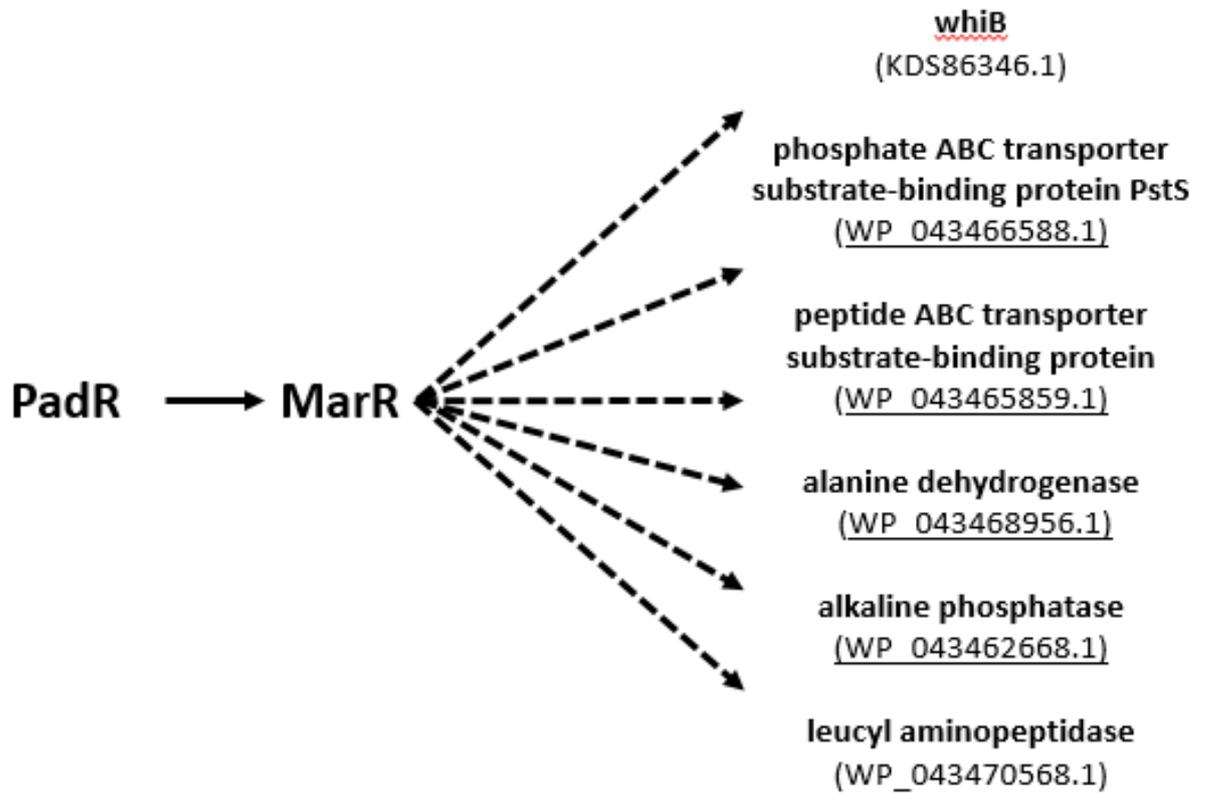


Рисунок 7.13. Предполагаемая схема участия транскрипционного регулятора PadR в регуляции других генов у *S. fradiae* ATCC 19609

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, таких как бактерии рода *Actinobacterium* и *Corynebacterium*. Были определены МИК олигомицина А и ряда его полусинтетических производных штамма *S. fradiae* ATCC 19609. Данный штамм был 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 даунорубицин-устойчивого белка (DrrC, 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 пуромицин-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-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину. Проведено полногеномное секвенирование этих мутантных штаммов. Геномы двух мутантных штаммов были депонированы в системе NCBI (JNAD00000000, MCNU00000000). Комплексный сравнительно-геномный биоинформатический анализ геномов полученных

мутантных штаммов позволил выявить мутации в ДНК-хеликазе IV класса у штамма, устойчивого к (33S)-33-дезокси-33-тиоцианатоолигомицину и мутацию в полифункциональном транскрипционном регуляторе PadR у 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, которая привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезокси-33-тиоцианатоолигомицину), который приводит к уменьшению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам.

Дополнительно был произведен функциональный анализ гена *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 схема регуляции генов, вовлеченных в процесс спорообразования и выброса антибиотика из клетки, контролируемых PadR, а также схема возникновения механизмов устойчивости к производным олигомицина А.

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 у 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-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину фенотипически не отличается от исходного штамма.
4. Выявлена мутация в гене хеликазы IV штамма, устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину, вероятно 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 гипотетическая схема регуляции генов, вовлеченных в процесс спорообразования и выброса антибиотика из клетки, контролируемых *PadR*.

Список сокращений

АДФ	аденозиндифосфат
АМФ	аденозинмонофосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
МИК	Минимальная ингибирующая концентрация
CYP3A4	цитохромом P450 3A4
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
GPCR	рецепторы G-белка
IPTG	Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
MDR	Множественная лекарственная устойчивость
P _i	неорганический фосфат
SNP	единичная нуклеотидная замена

Список литературы

1. Abrahams J.P., Buchanan S.K., Raaij M.J. Van, Fearnley I.M., Leslie A.G., Walker J.E. The structure of bovine F₁-ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, 93(18), Pp. 9420–4.
2. Ahmad Z., Laughlin T.F. Medicinal chemistry of ATP synthase: a potential drug target of dietary polyphenols and amphibian antimicrobial peptides. // *Curr. Med. Chem.* 2010, 17(25), Pp. 2822–36.
3. Ahmad Z., Okafor F., Laughlin T.F. Role of Charged Residues in the Catalytic Sites of *Escherichia coli* ATP Synthase. // *J. Amino Acids.* 2011, 2011, Pp. 785741.
4. Alekseeva M.G., Elizarov S.M., Bekker O.B., Lubimova I.K., Danilenko V.N. F₀F₁ ATP Synthase of Streptomycetes: Modulation of Activity and Oligomycin Resistance by Protein Ser/Thr Kinases // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2009, 3(1), Pp. 16–23.
5. Alekseeva M.G., Mironcheva T.A., Mavletova D.A., Elizarov S.M., Zakharevich N. V., Danilenko V.N. F₀F₁ ATPase Danilenko Alekseeva // *Biochem.* 2015, 80(3), Pp. 296–309.
6. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Göhlmann H.W.H., Neefs J.-M., Winkler H., Gestel J. Van, Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., Chaffoy D. de, Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Science.* 2005, 307(5707), Pp. 223–7.
7. Arthur M., Autissier D., Courvalin P. Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. // *Nucleic Acids Res.* 1986, 14(12), Pp. 4987–99.
8. Balemans W., Vranckx L., Lounis N., Pop O., Guillemont J., Vergauwen K.,

- Mol S., Gilissen R., Motte M., Lançois D., Bolle M. De, Bonroy K., Lill H., Andries K., Bald D., Koul A. Novel antibiotics targeting respiratory ATP synthesis in Gram-positive pathogenic bacteria. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56(8), Pp. 4131–9.
9. Baltz R.H. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 43(2-3), Pp. 343–370.
10. Barrasa M.I., Tercero J.A., Lacalle R.A., Jimenez A. The *ard1* gene from *Streptomyces capreolus* encodes a polypeptide of the ABC-transporters superfamily which confers resistance to the aminonucleoside antibiotic A201A. // *Eur. J. Biochem.* 1995, 228(3), Pp. 562–9.
11. Bearden D.T., Rodvold K.A. Penetration of macrolides into pulmonary sites of infection // *Infect. Med.* 1999, 16(7), Pp. 480–484A.
12. Bekker O.B., Elizarov S.M., Alekseeva M.T., Liubimova I.K., Danilenko V.N. CA2_-dependent modulation of antibiotic resistance in *Streptomyces lividans* 66 and *Streptomyces coelicolor* A3(2). // *Mikrobiologiya.* 2008, 77, Pp. 630–638.
13. 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 // 2014, 2(6), Pp. e01247–14.
14. Bos C., Stadler D. Fungal genetics: principles and practice. , 1996. 13-42 c.
15. Boyer P.D. The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993, 1140(3), Pp. 215–50.
16. Boyer P.D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. // *Annu. Rev. Biochem.* 1997, 66, Pp. 717–49.
17. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding //

Anal. Biochem. 1976, 72, Pp. 248–254.

18. Brodersen D.E., Clemons W.M., Carter A.P., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit // Cell. 2000, 103(7), Pp. 1143–1154.

19. Bujnicki J.M., Blumenthal R.M., Rychlewski L. Sequence Analysis and Structure Prediction of 23S rRNA:m¹G Methyltransferases Reveals a Conserved Core Augmented with a Putative Zn-Binding Domain in the N-Terminus and Family-Specific Elaborations in the C-Terminus // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2002, 4(1), Pp. 93–99.

20. Bullough D.A., Ceccarelli E.A., Roise D., Allison W.S. Inhibition of the bovine-heart mitochondrial F₁-ATPase by cationic dyes and amphipathic peptides. // Biochim. Biophys. Acta. 1989, 975(3), Pp. 377–83.

21. Bush M.J., Chandra G., Bibb M.J., Findlay K.C., Buttner M.J. Genome-Wide Chromatin Immunoprecipitation Sequencing Analysis Shows that WhiB Is a Transcription Factor That Cocontrols Its Regulon with WhiA To Initiate Developmental Cell Division in *Streptomyces*. // MBio. 2016, 7(2), Pp. e00523–16.

22. Calcutt M.J., Schmidt F.J. Gene organization in the bleomycin-resistance region of the producer organism *Streptomyces verticillus*. // Gene. 1994, 151(1-2), Pp. 17–21.

23. Capaldi R.A., Aggeler R., Moser T.L., al. et, Weber J., Senior A.E., Boyer P.D., Bianchet M.A., al. et, Boyer P.D., Cox G.B., al. et, Berden J.A., Hartog A.F., Gogol E.P., al. et, Abrahams J.P., al. et, Aggeler R., et al. Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor // Trends Biochem. Sci. 2002, 27(3), Pp. 154–160.

24. Carter A.P., Clemons W.M., Brodersen D.E., Morgan-Warren R.J., Wimberly

- B.T., Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. // *Nature*. 2000, 407(6802), Pp. 340–8.
25. Chater K.F., Bruton C.J., Plaskitt K.A., Buttner M.J., Méndez C., Helmann J.D. The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility σ factor of *B. subtilis* // *Cell*. 1989, 59, Pp. 133–143.
26. Chène P. PcrA/UvrD/Rep DNA helicases in bacterial genomes // *Biochem. Syst. Ecol.* 2008.
27. Choi D., Choi O.Y., Shin H.-J., Chung D.-O., Shin D.-Y. Tylosin production by *Streptomyces fradiae* using raw cornmeal in airlift bioreactor. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17(7), Pp. 1071–8.
28. Coates A., Hu Y., Bax R., Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002, 1(11), Pp. 895–910.
29. Cole S.T., Alzari P.M. Microbiology. TB--a new target, a new drug. // *Science*. 2005, 307(5707), Pp. 214–5.
30. Cundliffe E. Organization and control of the tylosin-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*. // *Actinomycetologica*. 1999, (13), Pp. 68–75.
31. Daisuke K., Makoto K., Kaoru Y., Kazuyoshi Y., Mayumi K. Oligomycin SC compounds and anticancer medicine. // 1997.
32. Danilenko A.N., Bibikova M. V, Spiridonova I.A., Grammatikova N.E., Katlinskiĭ A. V. [Physico-chemical properties and structure of oligomycin SC-II, produced by *Streptomyces virginiae* 17]. // *Antibiot. i khimioterapiia = Antibiot. chemotherapy [sic]*. 2012, 57(11-12), Pp. 3–7.
33. Devenish R.J., Prescott M., Roucou X., Nagley P. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000, 1458(2-3), Pp. 428–42.

34. Dibrova D. V, Galperin M.Y., Mulkidjanian A.Y. Characterization of the N-ATPase, a distinct, laterally transferred Na⁺-translocating form of the bacterial F-type membrane ATPase. // *Bioinformatics*. 2010, 26(12), Pp. 1473–6.
35. Diez M., Zimmermann B., Börsch M., König M., Schweinberger E., Steigmiller S., Reuter R., Felekyan S., Kudryavtsev V., Seidel C.A.M., Gräber P. Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, 11(2), Pp. 135–41.
36. Dittrich W., Betzler M., Schrempf H. An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein // *Mol. Microbiol.* 1991, 5(11), Pp. 2789–2797.
37. Drainas D., Kalpaxis D.L., Coutsogeorgopoulos C. Inhibition of ribosomal peptidyltransferase by chloramphenicol. Kinetic studies. // *Eur. J. Biochem.* 1987, 164(1), Pp. 53–8.
38. Dröse S., Altendorf K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. // *J. Exp. Biol.* 1997, 200(Pt 1), Pp. 1–8.
39. Dumina M. V, Zhgun A.A., Kerpichnikov I. V, Domracheva A.G., Novak M.I., Valiakmetov A.I., Knorre D.A., Severin F.F., Él'darov M.A., Bartoshevich I.É. [Functional characteristic of the CefT transporter of the MFS family involved in the transportation of beta-lactam antibiotics in *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae*]. // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 2013, 49(4), Pp. 372–81.
40. Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. // *Cancer Res.* 1997, 57(10), Pp. 1835–40.
41. Elander R. Enhanced penicillin biosynthesis in mutant and recombinant strains of *Penicillium chrysogenum*. In: Stubbe H (ed) *Induced mutations and their utilization*. Akademie-Verlag, // Akademie-Verlag. 1967, Pp. 403.
42. Elliot M.A., Bibb M.J., Buttner M.J., Leskiw B.K. BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Mol. Microbiol.*

2001, 40(1), Pp. 257–269.

43. Enomoto Y., Shiomi K., Matsumoto A., Takahashi Y., Iwai Y., Harder A., Kölbl H., Woodruff H.B., Omura S. Isolation of a new antibiotic oligomycin G produced by *Streptomyces* sp. WK-6150. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2001, 54(3), Pp. 308–13.

44. Fernández E., Lombó F., Méndez C., Salas J.A. An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus* // *MGG Mol. Gen. Genet.* 1996, 251(6), Pp. 692–698.

45. Fibriansah G., Kovacs A.T., Pool T.J., Boonstra M., Kuipers O.P., Thunnissen A.M.W.H. Crystal Structures of Two Transcriptional Regulators from *Bacillus cereus* Define the Conserved Structural Features of a PadR Subfamily // *PLoS One*. 2012, 7(11), Pp. e48015.

46. Fillingame R.H., Steed P.R. Half channels mediating H⁺ transport and the mechanism of gating in the Fo sector of *Escherichia coli* F1Fo ATP synthase // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2014, 1837(7), Pp. 1063–1068.

47. Fletcher J.I., Haber M., Henderson M.J., Norris M.D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps // *Nat. Rev. Cancer*. 2010, 10(2), Pp. 147–156.

48. Florez A.B., Alvarez S., Zabala D., Braña A.F., Salas J.A., Mendez C. Transcriptional regulation of mithramycin biosynthesis in *Streptomyces argillaceus*: Dual role as activator and repressor of the PadR-like regulator MtrY // *Microbiol. (United Kingdom)*. 2015, Pp. in Press.

49. Folcher M., Gaillard H., Nguyen L.T., Nguyen K.T., Lacroix P., Bamas-Jacques N., Rinkel M., Thompson C.J. Pleiotropic Functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* Autoregulator Receptor in Development, Antibiotic Biosynthesis, and Expression of a Superoxide Dismutase // *J. Biol. Chem.* 2001, 276(47), Pp.

44297–44306.

50. Galanis M., Mattoon J.R., Nagley P. Amino acid substitutions in mitochondrial ATP synthase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to venturicidin or ossamycin resistance. // *FEBS Lett.* 1989, 249(2), Pp. 333–6.

51. Gao Y.Q., Yang W., Karplus M. A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase. // *Cell.* 2005, 123(2), Pp. 195–205.

52. García J.J., Ogilvie I., Robinson B.H., Capaldi R.A. Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtdna. // *J. Biol. Chem.* 2000, 275(15), Pp. 11075–81.

53. Giguère S. (Steeve). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. : Blackwell Pub, 2006. 626 c.

54. Gledhill J.R., Walker J.E. Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. // *Biochem. J.* 2005, 386(Pt 3), Pp. 591–8.

55. Gogarten J.P., Starke T., Kibak H., Fishman J., Taiz L. Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. // *J. Exp. Biol.* 1992, 172, Pp. 137–47.

56. Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I., Green D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. // *Nat. Cell Biol.* 2000, 2(3), Pp. 156–62.

57. Grigoras I., Lazard M., Plateau P., Blanquet S. Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ABC-transporter Yor1p overexpressed in plasma membranes. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008, 1778(1), Pp. 68–78.

58. Guilfoile P.G., Hutchinson C.R. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991, 88(19), Pp. 8553–7.

59. Guo P., Noji H., Yengo C.M., Zhao Z., Grainge I. Biological Nanomotors with a Revolution, Linear, or Rotation Motion Mechanism. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016, 80(1), Pp. 161–86.
60. Gwynn E.J., Smith A.J., Guy C.P., Savery N.J., McGlynn P., Dillingham M.S. The Conserved C-Terminus of the PcrA/UvrD Helicase Interacts Directly with RNA Polymerase // *PLoS One*. 2013.
61. Hancock R.E., Chapple D.S. Peptide antibiotics. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(6), Pp. 1317–23.
62. Healy C., Golby P., MacHugh D.E., Gordon S. V. The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase // *Tuberculosis*. 2016, 97, Pp. 154–162.
63. Heravi K.M., Lange J., Watzlawick H., Kalinowski J., Altenbuchner J. Transcriptional regulation of the vanillate utilization genes (vanABK operon) of *Corynebacterium glutamicum* by VanR, a PadR-like repressor // *J. Bacteriol.* 2015, 197, Pp. 959–972.
64. Hong S., Pedersen P.L. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008, 72(4), Pp. 590–641, Table of Contents.
65. Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Schrempf H. *A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation. , 1985.
66. Huillet E., Velge P., Vallaeyts T., Pardon P. LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 254, Pp. 87–94.
67. Hwang J., Lee K., Phadtare S., Inouye M. Identification of two DNA helicases

- UvrD and DinG as suppressors for lethality caused by mutant *cspA* mRNAs // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2012.
68. Ikemoto H., Tani E., Ozaki I., Kitagawa H., Arita N. Calphostin C-mediated translocation and integration of Bax into mitochondria induces cytochrome c release before mitochondrial dysfunction. // *Cell Death Differ.* 2000, 7(6), Pp. 511–20.
69. Itoh H., Takahashi A., Adachi K., Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K. Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. // *Nature.* 2004, 427(6973), Pp. 465–8.
70. Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. NCBI BLAST: a better web interface. // *Nucleic Acids Res.* 2008, 36(Web Server issue), Pp. W5–9.
71. Jorgensen J.H., Ferraro M.J., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices // *Clin. Infect. Dis.* 2009, 49(11), Pp. 1749–1755.
72. Kabaleeswaran V., Puri N., Walker J.E., Leslie A.G.W., Mueller D.M. Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase. // *EMBO J.* 2006, 25(22), Pp. 5433–42.
73. Kabaleeswaran V., Shen H., Symersky J., Walker J.E., Leslie A.G.W., Mueller D.M. Asymmetric structure of the yeast F1 ATPase in the absence of bound nucleotides. // *J. Biol. Chem.* 2009, 284(16), Pp. 10546–51.
74. Karrasch S., Walker J.E. Novel features in the structure of bovine ATP synthase. // *J. Mol. Biol.* 1999, 290(2), Pp. 379–84.
75. Kaval K.G., Hahn B., Tusamda N., Albrecht D., Halbedel S. The PadR-like transcriptional regulator LftR ensures efficient invasion of *Listeria monocytogenes* into human host cells // *Front. Microbiol.* 2015, 6, Pp. 772.
76. Kelemen G.H., Zalacain M., Culebras E., Seno E.T., Cundliffe E.

Transcriptional attenuation control of the tylosin-resistance gene *tlrA* in *Streptomyces fradiae*. // *Mol. Microbiol.* 1994, 14(4), Pp. 833–42.

77. Khaliq S., Ghauri M.A., Akhtar K. Characterization of mutations in regulatory genes of Tyl cluster leading to overexpression of tylosin in mutant γ -1 of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98(2), Pp. 785–793.

78. Khataee H.R., Khataee A.R. Advances in F₀F₁-ATP Synthase biological protein nanomotor: from mechanisms and strategies to potential applications // *Nano.* 2009, 04(02), Pp. 55–67.

79. Kim, B. S., Surk Sik Moon, S. S. & Hwang B.K. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani* // *Can. J. Bot.* 1999, 77, Pp. 850–858.

80. Kim H.S., Band H.J., Lee S.Y., Yoo O.J., Yoo J.C., Kim Y.H., Lee J.J. 44-Homooligomycin E, a new cytotoxic macrolide antibiotic from *Streptomyces ostreogriseus*. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61(2), Pp. 378–80.

81. Kobayashi K., Nishino C., Ohya J., Sato S., Mikawa T., Shiobara Y., Kodama M., Nishimoto N. Oligomycin E, a new antitumor antibiotic produced by *Streptomyces* sp. MCI-2225. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1987, 40(7), Pp. 1053–7.

82. Kono M., O'Hara K., Ebisu T. Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase type II from a strain of *Escherichia coli* highly resistant to macrolide antibiotics. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 76(1-2), Pp. 89–94.

83. Korystov Y.N., Kublik L.N., Kudryavtsev A.A., Levitman M.K., Shaposhnikova V. V, Drinyaev V.A., Mosin V.A., Kruglyak E.B., Sterlina T.S., Chailakhyan L.M. Opposite effects of low oligomycin concentrations on the apoptosis of normal and tumor cells. // *Dokl. Biol. Sci.* 2003, 392, Pp. 475–7.

84. Koul A., Dendouga N., Vergauwen K., Molenberghs B., Vranckx L., Willebrords R., Ristic Z., Lill H., Dorange I., Guillemont J., Bald D., Andries K.

Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase // *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3(6), Pp. 323–324.

85. Koul A., Vranckx L., Dendouga N., Balemans W., Wyngaert I. Van den, Vergauwen K., Göhlmann H.W.H., Willebrords R., Poncelet A., Guillemont J., Bald D., Andries K. Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. // *J. Biol. Chem.* 2008, 283(37), Pp. 25273–80.

86. Kucharczyk R., Zick M., Bietenhader M., Rak M., Couplan E., Blondel M., Caubet S.-D., Rago J.-P. di. Mitochondrial ATP synthase disorders: Molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2009, 1793(1), Pp. 186–199.

87. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature.* 1970, 227(5259), Pp. 680–5.

88. LaVallie E.R., DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. // *Biotechnology.* (N. Y). 1993, 11(2), Pp. 187–93.

89. Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S., Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. // *J. Exp. Med.* 1997, 185(8), Pp. 1481–6.

90. Leslie A.G., Walker J.E. Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2000, 355(1396), Pp. 465–71.

91. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013, 12(5), Pp. 371–387.

92. Li W., Sharma M., Kaur P. The DrrAB efflux system of *Streptomyces peucetius* is a multidrug transporter of broad substrate specificity. // *J. Biol. Chem.*

2014, 289(18), Pp. 12633–46.

93. Li Y.C., Fung K.P., Kwok T.T., Lee C.Y., Suen Y.K., Kong S.K.

Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells. // *Chemotherapy*. 2004, 50(2), Pp. 55–62.

94. Lin X., Wen Y., Li M., Chen Z., Guo J., Song Y., Li J. A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines in vitro // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 81(5), Pp. 839–845.

95. Linton K.J., Cooper H.N., Hunter I.S., Leadlay P.F. An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetronasin. // *Mol. Microbiol.* 1994, 11(4), Pp. 777–85.

96. Liu M., Douthwaite S. Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria // *Mol. Microbiol.* 2002.

97. Liu M., Kirpekar F., Wezel G.P. Van, Douthwaite S. The tylosin resistance gene *tlrB* of *Streptomyces fradiae* encodes a methyltransferase that targets G748 in 23S rRNA. // *Mol. Microbiol.* 2000, 37(4), Pp. 811–20.

98. Liutskanova D.G., Stoilova-Disheva M.M., Peltekova V.T. [Increase in tylosin production by a commercial strain of *Streptomyces fradiae*]. // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 2005, 41(2), Pp. 189–93.

99. Lovett S.T., Sutra V.A. Suppression of *recJ* exonuclease mutants of *Escherichia coli* by alterations in DNA helicases II (*uvrD*) and IV (*helD*). // *Genetics*. 1995, 140(1), Pp. 27–45.

100. Lysenkova L.N., Godovikov I.A., Korolev A.M., Danilenko V.N., Bekker O.B., Mavletova D.A., Vatlin A.A., Shchekotikhin A.E., Gause G.F. Synthesis and Anti -Actinomycotic Activity of the Oligomycin A Thiocyanato Derivative Modified at 2 -Oxypropyl Side Chain // *Macroheterocycles*. 2015, 8(4), Pp. 424–

428.

101. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Danilenko V.N., Korolev A.M., Preobrazhenskaya M.N. The first examples of chemical modification of oligomycin A // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2009, 63, Pp. 17–22.
102. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M., Danilenko V.N., Bekker O.B., Dezhenkova L.G., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Study on retroaldol degradation products of antibiotic oligomycin A. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2014, 67(2), Pp. 153–8.
103. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M., Dezhenkova L.G., Bekker O.B., Shtil A.A., Danilenko V.N., Preobrazhenskaya M.N. Synthesis and cytotoxicity of oligomycin A derivatives modified in the side chain // *Bioorganic Med. Chem.* 2013, 21, Pp. 2918–2924.
104. Marshall N.J., Piddock L.J. Antibacterial efflux systems. // *Microbiol. (Madrid, Spain)*. 1997, 13(3), Pp. 285–300.
105. Matsuyama S., Xu Q., Velours J., Reed J.C. The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. // *Mol. Cell*. 1998, 1(3), Pp. 327–36.
106. Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. // *Trends Microbiol.* 1997, 5(3), Pp. 102–9.
107. Mazzei T, Mini E, Novelli A P.P. Chemistry and mode of action of macrolides. // *J Antimicrob Chemother.* 1993, C(1-9).
108. McManus M.C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. // *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 1997, 54(12), Pp. 1420–33; quiz 1444–6.
109. Méndez C., Salas J.A. ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998.
110. Menz R.I., Walker J.E., Leslie A.G. Structure of bovine mitochondrial F(1)-

ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. // *Cell*. 2001, 106(3), Pp. 331–41.

111. Mills K.I., Woodgate L.J., Gilkes A.F., Walsh V., Sweeney M.C., Brown G., Burnett A.K. Inhibition of mitochondrial function in HL60 cells is associated with an increased apoptosis and expression of CD14. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 263(2), Pp. 294–300.

112. Müller V., Ruppert C., Lemker T. Structure and function of the A1A0-ATPases from methanogenic Archaea. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999, 31(1), Pp. 15–27.

113. Nagley P., Hall R.M., Ooi B.G. Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin or venturicidin resistance. // *FEBS Lett.* 1986, 195(1-2), Pp. 159–63.

114. Nakata M., Ishiyama T., Akamatsu S., Hirose Y., Maruoka H., Suzuki R., Tatsuta K. Synthetic Studies on Oligomycins. Synthesis of the Oligomycin B Spiroketal and Polypropionate Portions // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1995, 68(3), Pp. 967–989.

115. Nelson N., Perzov N., Cohen A., Hagai K., Padler V., Nelson H. The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. // *J. Exp. Biol.* 2000, 203(Pt 1), Pp. 89–95.

116. Nishikiori T., Yamazaki M., Saito S., Shimada N., Kurokawa T., Hirose K., Yamshita T., Tsuchiya T., Harada T. Antibiotic NK86–0279, process for production of the same and application of the same. // 1991.

117. Noguchi N., Takada K., Katayama J., Emura A., Sasatsu M. Regulation of transcription of the *mph(A)* gene for macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*: characterization of the regulatory gene *mphR(A)*. // *J. Bacteriol.* 2000, 182(18), Pp. 5052–8.

118. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. //

J. Biol. Chem. 1975, 250(10), Pp. 4007–21.

119. O'Hara K., Kanda T., Ohmiya K., Ebisu T., Kono M. Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33(8), Pp. 1354–7.

120. Olano C., Rodríguez A.M., Méndez C., Salas J.A. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. // *Mol. Microbiol.* 1995, 16(2), Pp. 333–43.

121. Ostash B., Doud E., Walker S. ABC transporter genes from *Streptomyces ghanaensis* moenomycin biosynthetic gene cluster: roles in antibiotic production and export. // *Arch. Microbiol.* 2012, 194(11), Pp. 915–22.

122. Ounissi H., Courvalin P. Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. // *Gene.* 1985, 35(3), Pp. 271–8.

123. Pagliarani A., Nesci S., Ventrella V. Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial F₁F₀-ATPase. // *Mitochondrion.* 2013, 13(4), Pp. 312–9.

124. Palmer R.A., Potter B.S. X-ray Structures and Absolute Configurations of the Antibiotics Oligomycins A, B and C: Inhibitors of ATP Synthase // *J. Chem. Crystallogr.* 2008, 38(4), Pp. 243–253.

125. Park J.W., Park S.R., Han A.R., Ban Y.-H., Yoo Y.J., Kim E.J., Kim E., Yoon Y.J. Generation of reduced macrolide analogs by regio-specific biotransformation // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2011, 64(1), Pp. 155–157.

126. Peschke U., Schmidt H., Zhang H.Z., Piepersberg W. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. // *Mol. Microbiol.* 1995, 16(6), Pp. 1137–56.

127. Pogoryelov D., Krah A., Langer J.D., Yildiz Ö., Faraldo-Gómez J.D., Meier T. Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F_o complex of ATP synthases // *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6(12), Pp. 891–899.

128. Prabha D., Palaniswamy S. L-Alanine Sodium Nitrate (ASN), NLO Material: Growth and Characterization // *Int. J. Chem. Environ. Pharm. Res.* 2010, 1(1), Pp. 54–60.
129. Raaij M.J. van, Abrahams J.P., Leslie A.G., Walker J.E. The structure of bovine F1-ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, 93(14), Pp. 6913–7.
130. Riley G.L., Tucker K.G., Paul G.C., Thomas C.R. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. // *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 68(2), Pp. 160–72.
131. Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J., Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(12), Pp. 2823–30.
132. Rodloff A., Bauer T., Ewig S., Kujath P., Müller E. Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. // *Dtsch. Arztebl. Int.* 2008, 105(39), Pp. 657–62.
133. Rodríguez A.M., Olano C., Vilches C., Méndez C., Salas J.A. Streptomyces antibioticus contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. // *Mol. Microbiol.* 1993, 8(3), Pp. 571–82.
134. Rosteck P.R., Reynolds P.A., Hershberger C.L. Homology between proteins controlling Streptomyces fradiae tylosin resistance and ATP-binding transport. // *Gene.* 1991, 102(1), Pp. 27–32.
135. Roy A., Reddi R., Sawhney B., Ghosh D.K., Addlagatta A., Ranjan A. Expression, Functional Characterization and X-ray Analysis of HosA, A Member of MarR Family of Transcription Regulator from Uropathogenic Escherichia coli // *Protein J.* 2016, 35(4), Pp. 269–282.

136. Sakharkar K.R., Sakharkar M.K., Chow V.T.K. Biocomputational strategies for microbial drug target identification. // *Methods Mol. Med.* 2008, 142, Pp. 1–9.
137. Salerno P., Persson J., Bucca G., Laing E., Ausmees N., Smith C.P., Flårdh K. Identification of new developmentally regulated genes involved in *Streptomyces coelicolor* sporulation // *BMC Microbiol.* 2013, 13, Pp. 281.
138. Salomon A.R., Voehringer D.W., Herzenberg L.A., Khosla C. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F(0)F(1)-ATPase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97(26), Pp. 14766–71.
139. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* , 1989.
140. Sato S., Iwata F., Yamada S., Katayama M. Neomacrolides A–I: Oligomycin-Class Macrolides from a Marine-Derived Actinomycete // *J. Nat. Prod.* 2012, 75(11), Pp. 1974–1982.
141. Schemidt R.A., Qu J., Williams J.R., Brusilow W.S. Effects of carbon source on expression of F₀ genes and on the stoichiometry of the c subunit in the F₁F₀ ATPase of *Escherichia coli*. // *J. Bacteriol.* 1998, 180(12), Pp. 3205–8.
142. Schlünzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. // *Nature.* 2001, 413(6858), Pp. 814–21.
143. Schoner B., Geistlich M., Rostek P., Rao R.N., Seno E., Reynolds P., Cox K., Burgett S., Hershberger C. Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins. // *Gene.* 1992, 115(1-2), Pp. 93–6.
144. Senior A.E. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. // *Physiol. Rev.* 1988, 68(1), Pp. 177–231.
145. Senior A.E., Nadanaciva S., Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1553(3), Pp.

188–211.

146. Shah N.B., Duncan T.M. Aerobic Growth of *Escherichia coli* Is Reduced, and ATP Synthesis Is Selectively Inhibited when Five C-terminal Residues Are Deleted from the ϵ Subunit of ATP Synthase. // *J. Biol. Chem.* 2015, 290(34), Pp. 21032–41.

147. Shchepina L.A., Pletjushkina O.Y., Avetisyan A. V, Bakeeva L.E., Fetisova E.K., Izyumov D.S., Saprunova V.B., Vyssokikh M.Y., Chernyak B. V, Skulachev V.P. Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. // *Oncogene.* 2002, 21(53), Pp. 8149–57.

148. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. // *Mol. Syst. Biol.* 2011, 7, Pp. 539.

149. Smith R.M., Peterson W.H., McCoy E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. // *Antibiot. Chemother. (Northfield, Ill.)*. 1954, 4(9), Pp. 962–70.

150. Song E., Rajesh T., Lee B.R., Kim E.J., Jeon J.M., Park S.H., Park H.Y., Choi K.Y., Kim Y.G., Yang Y.H., Kim B.G. Deletion of an architectural unit, leucyl aminopeptidase (SCO2179), in *Streptomyces coelicolor* increases actinorhodin production and sporulation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, Pp. 6823–6833.

151. Spratt B.G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. // *Science.* 1994, 264(5157), Pp. 388–93.

152. Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. // *Science.* 1999, 286(5445), Pp. 1700–5.

153. Symersky J., Osowski D., Walters D.E., Mueller D.M. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase // *PNAS.* 2012, 109(35), Pp. 13961–13965.

154. Tait-Kamradt A., Davies T., Appelbaum P.C., Depardieu F., Courvalin P., Petitpas J., Wondrack L., Walker A., Jacobs M.R., Sutcliffe J. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44(12), Pp. 3395–401.
155. Takano H., Toriumi N., Hirata M., Amano T., Ohya T., Shimada R., Kusada H., Amano S.-I., Matsuda K.-I., Beppu T., Ueda K. An ABC transporter involved in the control of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2016, 363(14).
156. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* 2013, 30(12), Pp. 2725–9.
157. Tenover F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. // *Am. J. Infect. Control.* 2006, 34(5 Suppl 1), Pp. S3–10; discussion S64–73.
158. Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. // *J. Mol. Biol.* 2003, 330(5), Pp. 1005–14.
159. Thamm S., Distler J. Properties of C-terminal truncated derivatives of the activator, StrR, of the streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 149(2), Pp. 265–272.
160. Thi, Nguyen K.C., Tran N.P., Cavin J.-F. Genetic and Biochemical Analysis of PadR-padC Promoter Interactions during the Phenolic Acid Stress Response in *Bacillus subtilis* 168 // *J. Bacteriol.* 2011, 193(16), Pp. 4180–4191.
161. Tikhonova E.B., Devroy V.K., Lau S.Y., Zgurskaya H.I. Reconstitution of the *Escherichia coli* macrolide transporter: the periplasmic membrane fusion protein MacA stimulates the ATPase activity of MacB // *Mol. Microbiol.* 2007, 63(3), Pp. 895–910.

162. Tocci N., Iannelli F., Bidossi A., Ciusa M.L., Decorosi F., Viti C., Pozzi G., Ricci S., Oggioni M.R. Functional Analysis of Pneumococcal Drug Efflux Pumps Associates the MATE DinF Transporter with Quinolone Susceptibility // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57(1), Pp. 248–253.
163. Toei M., Noji H. Single-molecule analysis of F₀F₁-ATP synthase inhibited by N,N-dicyclohexylcarbodiimide. // *J. Biol. Chem.* 2013, 288(36), Pp. 25717–26.
164. Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. // *Nature.* 2000, 405(6787), Pp. 647–55.
165. Vatlin A.A., Bekker O.B., Lysenkova L.N., Danilenko V.N. Draft Genome Sequence of *Streptomyces fradiae* olg1-1, a Strain Resistant to Nitro-oligomycin // *Genome Announc.* 2015, 3(5), Pp. e01252–15.
166. Vatlin A.A., Bekker O.B., Lysenkova L.N., Korolev A.M., Shchekotikhin A.E., Danilenko V.N. Sequencing and Analysis of the Resistome of *Streptomyces fradiae* ATCC19609 in Order to Develop a Test System for Screening of New Antimicrobial Agents // *Russ. J. Genet.* 2016, 52(6), Pp. 625–630.
167. Vester B., Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45(1), Pp. 1–12.
168. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. // *EMBO J.* 1982, 1(8), Pp. 945–51.
169. Walraven H.S. Van, Strotmann H., Schwarz O., Rumberg B. The H⁺/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. // *FEBS Lett.* 1996, 379(3), Pp. 309–13.
170. Watt I.N., Montgomery M.G., Runswick M.J., Leslie A.G.W., Walker J.E. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal

- mitochondria. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, 107(39), Pp. 16823–7.
171. Weber J. ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, 1757(9-10), Pp. 1162–70.
172. Weber J., Senior A.E. ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000, 1458(2-3), Pp. 300–9.
173. Weber T., Blin K., Duddela S., Krug D., Kim H.U., Bruccoleri R., Lee S.Y., Fischbach M.A., Müller R., Wohlleben W., Breitling R., Takano E., Medema M.H. antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. // *Nucleic Acids Res.* 2015, 43(W1), Pp. W237–43.
174. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39(3), Pp. 577–85.
175. Wender P.A., Jankowski O.D., Longcore K., Tabet E.A., Seto H., Tomikawa T. Correlation of F₀F₁-ATPase inhibition and antiproliferative activity of apoptolidin analogues. // *Org. Lett.* 2006, 8(4), Pp. 589–92.
176. Whitesides G.M. The «right» size in nanobiotechnology. // *Nat. Biotechnol.* 2003, 21(10), Pp. 1161–5.
177. Wilms R., Freiberg C., Wegerle E., Meier I., Mayer F., Muller V. Subunit Structure and Organization of the Genes of the A1A0 ATPase from the Archaeon *Methanosarcina mazei* Go1 // *J. Biol. Chem.* 1996, 271(31), Pp. 18843–18852.
178. Wolvetang E.J., Johnson K.L., Krauer K., Ralph S.J., Linnane A.W. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. // *FEBS Lett.* 1994, 339(1-2), Pp. 40–4.
179. Wright G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5(3), Pp. 175–186.
180. Yamazaki M., Yamashita T., Harada T., Nishikiori T., Saito S., Shimada N.,

- Fujii A. 44-Homooligomycins A and B, new antitumor antibiotics from *Streptomyces bottropensis*. Producing organism, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1992, 45(2), Pp. 171–9.
181. Yang P.W., Li M.G., Zhao J.Y., Zhu M.Z., Shang H., Li J.R., Cui X.L., Huang R., Wen M.L. Oligomycins A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus* // *Folia Microbiol. (Praha)*. 2010, 55(1), Pp. 10–16.
182. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L., VanGuilder H., Vrana K., Freeman W., Whiley D., Sloats T., Sipos R., Szekely A., Palatinszky M., Revesz S., Marialigeti K., Nikolausz M., Waterfall C., Eisenthal R., et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. 2012, 13(1), Pp. 134.
183. Yoshida M., Muneyuki E., Hisabori T. ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2(9), Pp. 669–77.
184. Yu T.-W., Hopwood D.A. Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor* *whiE* genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction with the *act* genes for actinorhodin biosynthesis // *Microbiology*. 1995, 141(11), Pp. 2779–2791.
185. Zhang Q., Chen Q., Zhuang S., Chen Z., Wen Y., Li J. A MarR family transcriptional regulator, DptR3, activates daptomycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces roseosporus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, Pp. in press.
186. Zhou Y., Liang Y., Lynch K.H., Dennis J.J., Wishart D.S. PHAST: a fast phage search tool. // *Nucleic Acids Res.* 2011, 39(Web Server issue), Pp. W347–52.
187. Алексеева М.Г., Елизаров С.М., Беккер О.Б., Любимова И.К. Д.В.Н.

F₀F₁–АТФ-синтаза стрептомицетов: модулирование активности и чувствительности к олигомицину серин-треониновыми протеинкиназами // Биологические мембраны. 2009, 26(1), Рр. 41–49.

Приложение 1.

```

1  MPPVFAHGRL RLYLLKLLDE APRRGYEVIR LLEERFQGLY APSAGTVYPR LAKLESEGLV
61 SHATEGGRKV YTLTEAGRDE LIARQAEIAD LEREIRESVA VLAAEIREDV RGSASELRRE
121 MRAAAERART ARTSGTARAH RGEYSGGPAE PGGPGDGGAR RRAQEETRRR KERQAHRAAQ
181 ESRRAERKAR RTGGQARDAQ DAVVEEIQRL ARRLQDQTQE HIRTGDWQRA VREGFAEITR
241 EVNRFSGGPG GRTGADAGPE TSTETSTDTG MAPETGTDTE TGARTGTAPA TAPPEPEWAR
301 EAPEPSGDPV RDLERLLDRF RDDIRDAARD HGVTEEQQLRE ARRHLSTAAA HIGVVLRGPD
361 RP

```

Рисунок 1. Аминокислотная последовательность PadR (KDS89815.1) мутантного штамма *S. fradiae* nitR^{+bld}, устойчивого к нитрон-олигомицину. Цветом выделены следующие домены: ... Helix-turn-helix domain, 20-97 аа DNA-binding transcriptional regulator domain. **R** – замена аминокислотного остатка Гистидина на аминокислотный остаток Аргинина (H(24)R) у мутантного штамма.

```

1  МААНЕАТВДС VRDRETGVEQ DHLDQVYRRL EEKIREAEFL MADAARRGQV GTPGALAERD
61 AOVFRAGLHL NRLNSEFEDF LFGRIDLLEG KDGERGPDGA FTSVEPADGA VRTGEDGRTY
121 AEIAETLHIG RIGVLDADYT PLVIDWRAPA AAPFYRATPV DPGRVVRVVV IRSKGRKVLG
181 VEDDLLRPEM TATLGGEELA VVGDGALMAA LGRARSHTMR DIVSSIQAEQ DKVIRAPAAS
241 VTEVGGGGPGT GKTAVALHRA AYLLYQDRRR YAGGILVVSP TPLLVAYTEG VLPSTLGEEQ
301 VAIRALGSLV DGAEATVYDE PAVARVKGSA RMQAVLRRRAA RGALEPARPD SPPGGRRGRRT
361 GGQLSFDDPE AGPDGAEPAE TAQPAGPVTG RLRVVAFGAR VELGPQELRE IRR TALGATT
421 PVNLLRPRAR RLLLDALWAK SGAAGRHSKD PELAAEAREA FDEDISGEPG FHAFLDAWWP
481 ELTPRGVLGA MADERRLGRW ARRVLQPGEV RRLARSLKRL GPDGRGPLSV HDVALLDELO
541 TLLGTPSRPR KRELDPLEQL TGLEEVTTFA DRSARRRPDR AVEERA EYAH VIVDEAQDLT
601 PMQWRMVGRR GRHATWTVVG DPAQSSWSDP EEAAGARDEA LGSRRPRRFT LTVNYRNP AE
661 VAEVAAKVLA LAMPGMEPPE AVRSTGLVPR FAVAGGDLGA AVRAEARRLL AEVDGTVGVV
721 VAMDRREEAR AWLAGLGERV VALGSLEAKG LEYD ATLVVS PAGIADESPA GLRVLYVALT
781 RATQRLTVLS AKRDAPDADG VPDLLRE*

```

Рисунок 2 Аминокислотная последовательность ДНК хеликазы IV (KDS85476.1) мутантного штамма *S. fradiae*, устойчивого к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину. Цветом выделены следующие домены: ... Part of AAA domain, ... P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases, ... UvrD_C_2, UvrD-like helicase C-terminal domain. **T** – замена аминокислотного остатка Аланина на аминокислотный остаток Треонина (A(600)T) у мутантного штамма.

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

Название соединения	Активность, нмоль/диск
33-дезоксиг-33-амино-олигомицин А	250
олигомицинА аннел. с3-бром-диметилтетра гидро-2Н-пираном	250
Оксим тетраацетат олигомицинаА	10
Тетраацетил олигомицинА	250
ЛХТА-2536	0,1
ЛХТА-2430	0,01
33-о-мезильное производное олигомицина А	0,1

Рисунок 3. Синтез производных олигомицина А, модифицированных по 33 положению боковой цепи: получение двух оптических изомеров (33S)- и (33R)-азидо-33-дезоксидолигомицин Olg2, Olg 6 и (33S)-33-тиоцианатолигомицина (Olg 4)

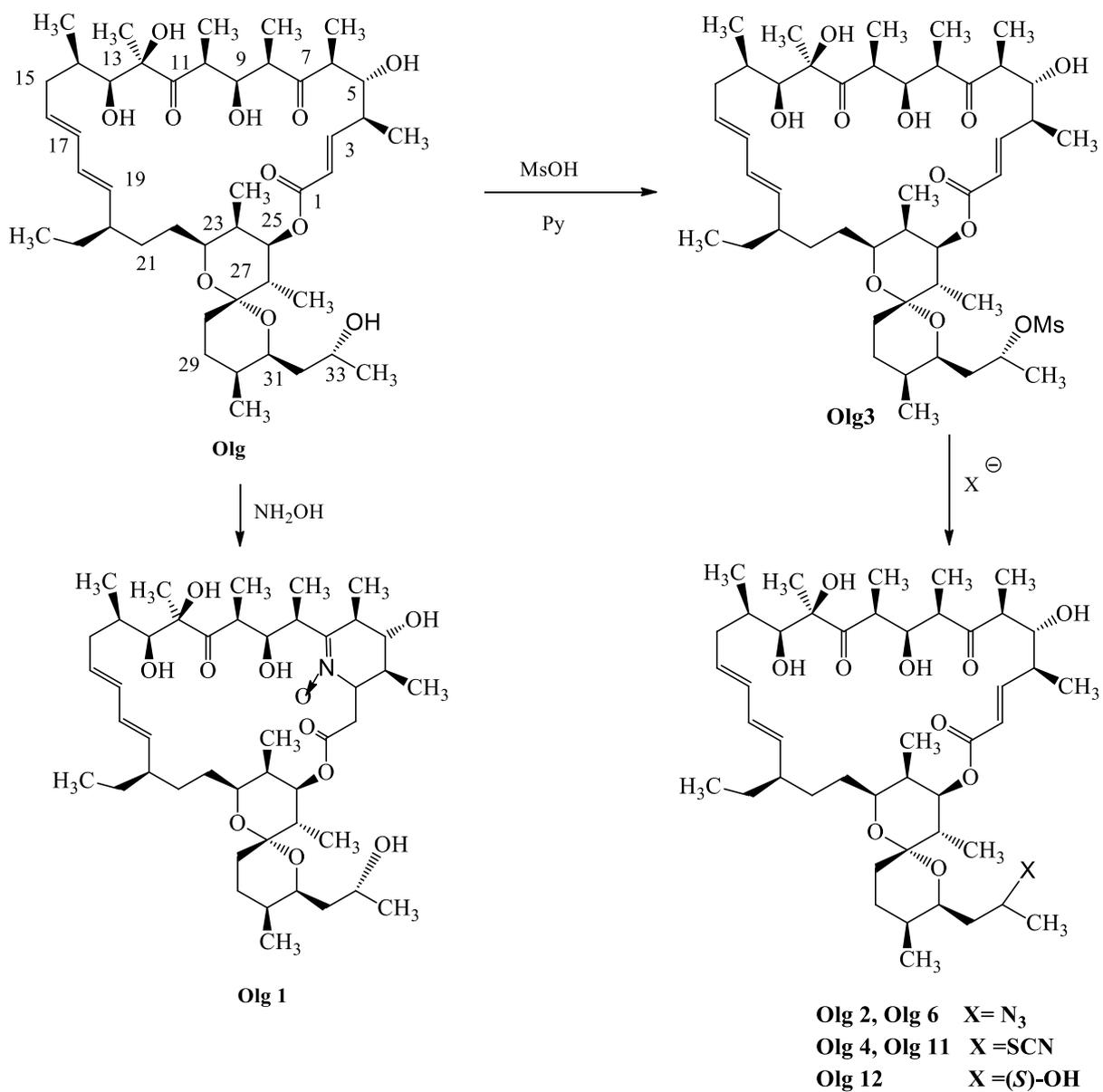


Рисунок 4. Синтез 16,17-дигидро-16,17-дигидроксиолигомицин-16,33-диформиата (Olg 15) и олигомицин-33-формиата (Olg 16).

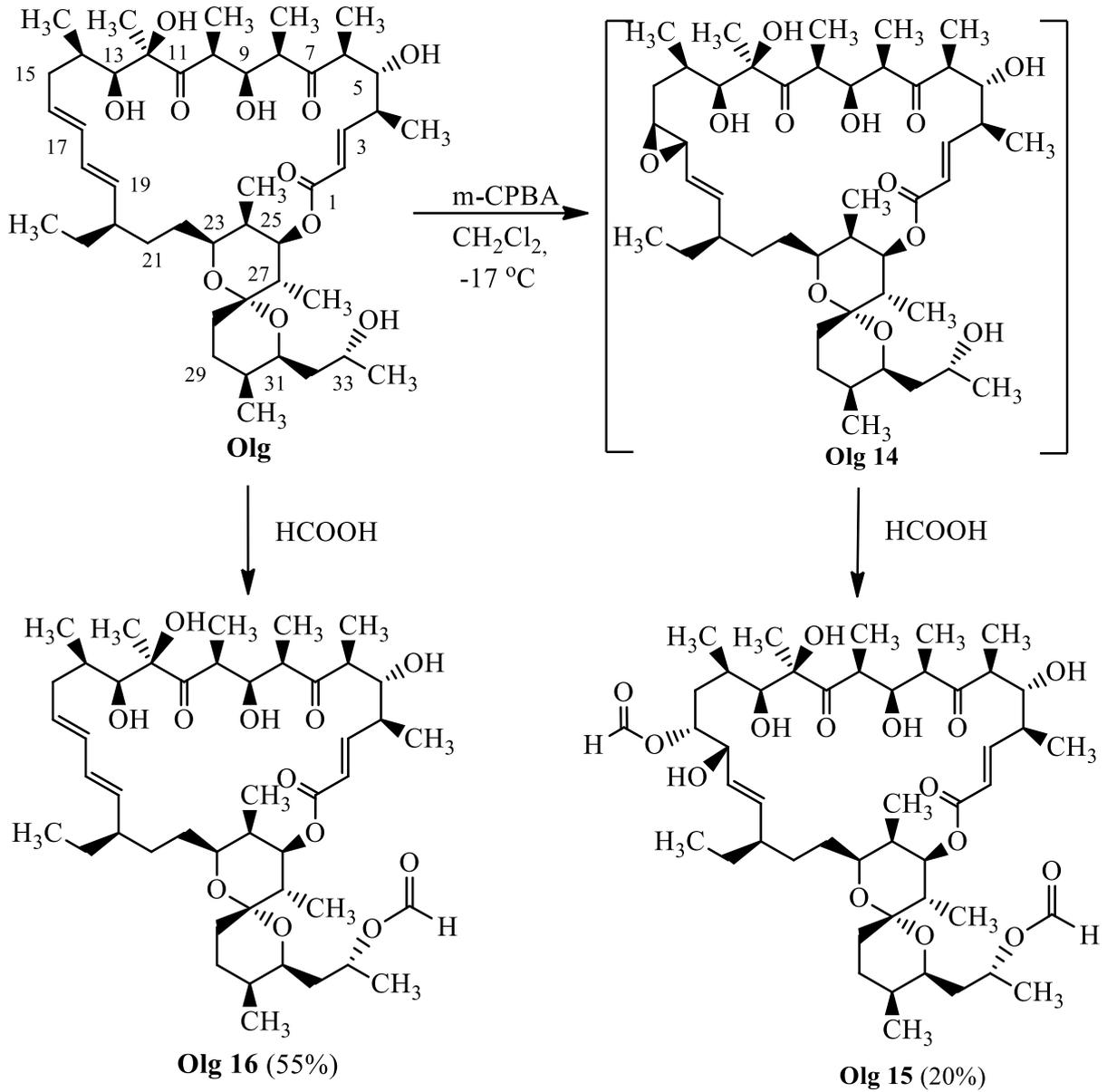
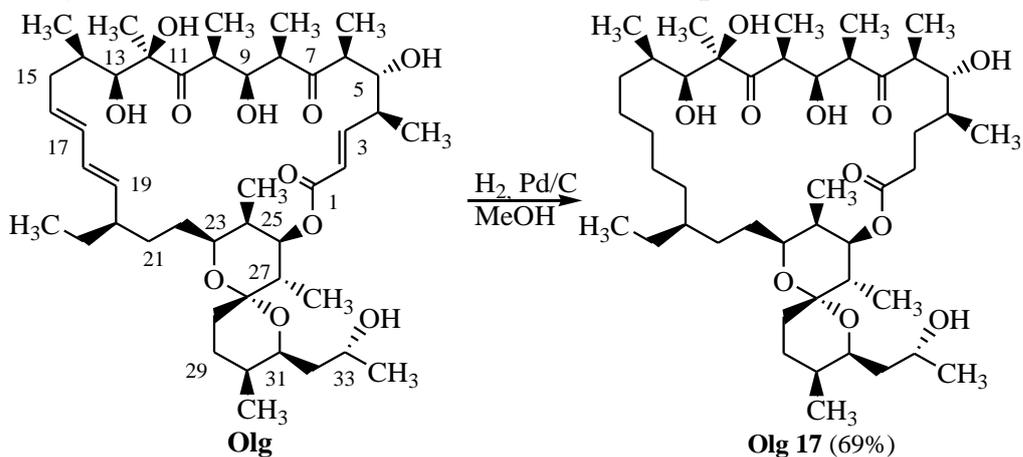


Рисунок 5. Синтез 2,3,16,17,18,19-гексагидроолигомицина А (Olg 17).



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 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 Николавену Лысенкову**.

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