

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

На правах рукописи

Рудакова Наталья Николаевна

**Экспрессия генов и структурно-функциональный анализ аминогликозидтрансфераз
*Streptomyces rimosus***

03.02.07 - генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

Даниленко Валерий Николаевич

Москва 2019 г.

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	14
Глава 1.1. Актинобактерии рода <i>Streptomyces</i> как резервуар генов лекарственной устойчивости	14
1.1.1. Понятие резистом	14
1.1.2. Общая информация об актинобактериях рода <i>Streptomyces</i>	15
1.1.3. Штаммы <i>Streptomyces rimosus</i>	18
Глава 1.2. Аминогликозидные антибиотики	19
1.2.1. Химическое строение	20
1.2.2. История открытия	21
1.2.3. Спектр активности аминогликозидов	21
1.2.4. Молекулярный механизм действия аминогликозидных антибиотиков	21
1.2.5. Применение аминогликозидов	23
1.2.6. Токсичность аминогликозидных антибиотиков	23
1.2.7. Продуценты аминогликозидов	24
Глава 1.3. Механизмы устойчивости к аминогликозидным антибиотикам	24
1.3.1. Устойчивость бактерий к антибиотикам путем модификации мишеней	25
1.3.2. Активный транспорт антибиотика из клетки и уменьшение проницаемости мембраны	25
1.3.3. Ферментативная модификация и деградация антибиотика в клетке	26
Глава 1.4. Аминогликозидфосфотрансферазы	27
1.4.1. Семейство аминогликозидфосфотрансфераз	27
1.4.2. Получение и анализ трехмерных структур аминогликозид-3'-фосфотрансфераз	34
1.4.3. Эволюционное и структурное сходство аминогликозидфосфотрансфераз и серин-треониновых протеинкиназ	39
1.4.4. Исследование ингибиторов аминогликозид-3'-фосфотрансфераз	42
Глава 1.5. Аминогликозидфосфотрансфераза Aph(3')-VIII	46
1.5.1. Амплификация и генетическая нестабильность гена <i>aph(3')-VIII</i>	47
1.5.2. Клонирование и экспрессия гена <i>aph(3')-VIII</i> в <i>Streptomyces lividans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	47

1.5.3. Исследование фосфотрансферазной активности Aph(3')-VIII <i>in vivo</i>	48
1.5.4. Выделение Aph(3')-VIII и определение субстратной специфичности.....	49
1.5.5. Способность Aph(3')-VIII фосфорилироваться протеинкиназами, выявление сайтов фосфорилирования	49
1.5.6. Трехмерная структура Aph(3')-VIII.....	50
1.5.7. Создание тест-систем для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ	51
Глава 2. Материалы и методы.....	54
2.1. Штаммы бактерий	54
2.2. Состав питательных сред.....	55
2.3. Условия культивирования	55
2.4. Техника посева при помощи штампа-репликатора.....	56
2.5. Определение устойчивости к антибиотикам методом стандартных дисков	56
2.6. Определение минимальной ингибирующей концентрации аминогликозидов методом линейных разведений	57
2.7. Векторы, использованные для клонирования фрагментов ДНК	57
2.8. Амплификация ДНК методом полимеразной цепной реакции.....	59
2.9. Транскрипционный анализ экспрессии генов штамма <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970	61
2.9.1. Выделение тотальной РНК штамма <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970	61
2.9.2. Проведение реакции обратной транскрипции	62
2.9.3. Амплификация ДНК в режиме реального времени.....	62
2.10. Молекулярное клонирование	63
2.11. Определение нуклеотидной последовательности отобранных клонов (сиквенс).....	64
2.12. Метод химической трансформации.....	64
2.13. Выделение плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid Miniprep Kit.....	65
2.14. Выделение фрагментов ДНК из ПЦР смеси с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit	66
2.15. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit	66
2.16. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.....	67
2.17. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле по Лэммли.....	67

2.18. Измерение концентрации белка на флюориметре	68
2.19. Выделение и очистка Aph белков методом металлоаффинной хроматографии.....	69
2.20. Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа.....	70
2.21. Анализ фосфотрансферазной активности белков <i>in vitro</i>	70
2.21.1. Метод тонкослойной хроматографии	71
2.21.2. Метод с использованием люминесцентной реакции	71
2.22. Исследование автофосфорилирования аминокликозидфосфотрансфераз <i>in vitro</i>	72
2.22.1. Метод с инкубацией [γ - ³² P]-АТФ.....	72
2.22.2. Метод с использованием люминесцентной реакции	72
2.23. Нарботка биомассы штамма <i>E. coli</i> BL21(DE3) с плазмидой pET16b: <i>aph</i> в ферментере для последующей кристаллизации белков.....	72
2.24. Биоинформатические методы анализа аминокликозидфосфотрансфераз	73
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	75
3.1. Изучение спектра устойчивости к аминокликозидам штамма <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970.....	75
3.2. Биоинформатический анализ <i>aph</i> -генов штамма <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970	76
3.3. Аминокликозидфосфотрансфераза <i>aph(3'')-Id</i> (<i>aphSR3</i>) – биоинформатические, функциональные и структурные характеристики	82
3.3.1. Биоинформатический анализ гена <i>aph(3'')-Id</i>	82
3.3.2. Изучение экспрессии гена <i>aph(3'')-Id</i> в <i>Escherichia coli</i>	83
3.3.3. Исследование спектра и уровня устойчивости клеток <i>Escherichia coli</i> , содержащих ген <i>aph(3'')-Id</i> , к аминокликозидным антибиотикам	85
3.3.4. Отработка условий выделения белка Aph(3'')-Id, получение рекомбинантного белка в количествах, необходимых для последующих структурно-функциональных исследований	88
3.3.5. Анализ фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id <i>in vitro</i>	90
3.3.6. Исследование автофосфорилирования рекомбинантного белка Aph(3'')-Id <i>in vitro</i> ..	92
3.3.7. Нарботка биомассы штамма <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) с плазмидой pET16b: <i>aph(3'')-Id</i> в ферментере для последующей кристаллизации белка Aph(3'')-Id	94
3.4 Аминокликозидфосфотрансфераза AphSR2: зависимость устойчивости к антибиотикам от серин-треониновых протеинкиназ	96

3.4.1. Биоинформатический анализ гена <i>aphSR2</i>	96
3.4.2. Совместное клонирование генов <i>aphSR2</i> и протеинкиназ <i>pkSR1</i> , <i>pkSR2</i> и изучение их экспрессии	98
3.4.3. Исследование спектра и уровня устойчивости клеток <i>Escherichia coli</i> , содержащих гены <i>aphSR2</i> , <i>pkSR1</i> и <i>pkSR2</i> к аминогликозидным антибиотикам.....	100
3.5. Клонирование остальных 11 <i>aph</i> -генов <i>Streptomyces rimosus</i> в <i>Escherichia coli</i> , анализ экспрессии и устойчивости к аминогликозидным антибиотикам	102
3.6. Проведение транскрипционного анализа экспрессии генов резистоста штамма <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970	104
3.6.1. Подбор субингибирующих концентраций антибиотиков	104
3.6.2. Анализ устойчивости культуры <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970 к антибиотикам при индукции стрептомицином в субингибирующей концентрации	105
3.6.3. Изучение экспрессии <i>aph</i> -генов при выращивании штамма <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970 в присутствии аминогликозидных антибиотиков.....	107
3.7. Другие гены, обуславливающие устойчивость штамма <i>Streptomyces rimosus</i> ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам.....	109
3.7.1. Биоинформатический анализ <i>aac</i> и <i>ant</i> генов <i>Streptomyces rimosus</i> ATCC 10970....	109
3.7.2. Клонирование гена аминогликозид ацетилтрансферазы <i>aacSR</i> в <i>Escherichia coli</i> ...	110
Заключение.....	114
Выводы.....	117
Список сокращений и условных обозначений	118
Список литературы	120
Приложение 1.....	139
Приложение 2.....	145
Приложение 3.....	150

Введение

Актуальность темы исследования

Устойчивость к антибиотикам является одной из самых больших проблем в современной медицине и глобальной угрозой для здравоохранения. В соответствии с информацией Центров по контролю и профилактике заболеваний, по крайней мере, 2 миллиона человек стали инфицированы бактериями, устойчивыми к антибиотикам и, по меньшей мере, 23 000 человек ежегодно умирают от заболеваний, вызванных устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами [Hossion and Sasaki, 2013]. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения обратилась в Организацию Объединенных Наций с просьбой обсудить данную проблему и принять соответствующие рекомендации. Проблема обусловлена не только катастрофическим распространением клинических штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), но и распространением МЛУ бактерий в продуктах питания, сельскохозяйственных животных и растениях, а также в почве и водных источниках [Link et al., 2007]. В связи с этим становится актуальным исследование почвенных бактерий как основного резервуара и источника генов лекарственной устойчивости [Gibson et al., 2015].

Аминогликозиды представляют собой большую группу биологически активных вторичных метаболитов [Davies and Wright, 1997]. С момента открытия данной группы антибактериальных препаратов их широко применяют в качестве терапевтического средства при лечении различных тяжелых инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными микроорганизмами [Hermann, 2007]. Однако спектр применения аминогликозидных антибиотиков сужается из-за появления бактерий, обладающих устойчивостью к ним [Wright et al., 1998]. Тем не менее, на сегодняшний день аминогликозиды являются одними из широко применяемых в клинической практике антибиотиков благодаря их высокой эффективности и низкой себестоимости [Forge and Schacht, 2000; Block, 2019].

Существует несколько основных механизмов устойчивости к аминогликозидам: модификация мишени действия аминогликозидов – рибосом; уменьшение проницаемости мембраны и активный транспорт из клетки; ферментативная модификация антибиотика; образование биопленок [Wright, 1999]. Ферменты, модифицирующие аминогликозиды, катализируют реакции модификации различных -ОН и -NH₂ групп 2-диоксистерптаминового ядра или остатков сахаров. К ним относятся нуклеотидилтрансферазы (аденилилтрансферазы), фосфотрансферазы и ацетилтрансферазы [Wright, 2011]. Ацетилтрансферазы модифицируют аминогруппу молекулы аминогликозида, фосфотрансферазы и аденилилтрансферазы действуют на гидроксильную группу. Действие аминогликозидмодифицирующих ферментов

(соответственно ацетилирование, фосфорилирование и аденилирование) приводит к такому изменению структуры молекулы антибиотика, которое не позволяет ему связываться с бактериальной рибосомой, в результате чего синтез белка не ингибируется, и бактериальная клетка сохраняет жизнеспособность [Zarate et al., 2018].

Распространенным механизмом устойчивости к аминогликозидам у штаммов бактерий является ферментативная модификация молекулы антибиотика [Frase et al., 2012]. Именно поэтому изучение структуры и функций аминогликозидтрансфераз является важной и актуальной задачей, позволяющей развивать подходы, применяемые для преодоления резистентности к аминогликозидным антибиотикам.

Аминогликозидфосфотрансферазы (Aph) (КФ 2.7.1.) – семейство ферментов, модифицирующих аминогликозидные антибиотики путем фосфорилирования их гидроксильных групп в присутствии АТФ. Aph впервые были обнаружены на плазидах и мобильных элементах у клинических штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий [Wright, 2011]. У актинобактерий – штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков были обнаружены Aph ферменты второго типа [Shi K., et al., 2013]. Позже были выявлены Aph ферменты третьего типа, обуславливающие природную устойчивость к аминогликозидам у других бактерий, включая почвенные бактерии [Perry et al., 2017].

Аминогликозидтрансферазы в настоящее время представляют серьезную угрозу для антимикробной терапии [Shakya and Wright, 2010; Ribeiro da Cunha, 2019]. Проведенный филогенетический анализ Aph из клинических штаммов и штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков выявил, что в зависимости от положения гидроксильной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают 7 подсемейств аминогликозидфосфотрансфераз: Aph(2"), Aph(3'), Aph(3"), Aph(4), Aph(6), Aph(7") и Aph(9) [Shakya et al., 2011]. Aph(4)-I и Aph(7")-I обеспечивают устойчивость бактерий к гигромицину, в то время как Aph(9)-I модифицирует спектиномицин, а Aph(2") играет важную роль в формировании устойчивости к гентамицину. Аминогликозидфосфотрансферазы Aph(3") и Aph(6) модифицируют 3"-ОН и 6"-ОН группы стрептомицина соответственно. Aph(6)-Ia (ген *aphD*) и Aph(6)-Ib (ген *sph*) обнаружены у штаммов-продуцентов стрептомицина, *Streptomyces griseus* и *Streptomyces glaucescens* [Ashenafi et al., 2014]. Недавно выявлен новый ген *aph* из штамма клинического изолята - *aph(5)*, выделенный из штамма *B. subtilis* subsp. *subtilis* RK [Parulekar et al., 2019].

Для преодоления проблемы устойчивости к антибиотикам комбинируют достижения в области секвенирования генома нового поколения, биоинформатики и аналитической химии.

Гены *aph* аннотированы во многих геномах, в том числе и у бактерий микрофлоры кишечника, откуда могут передаваться в клинические штаммы [Jandhyala et al., 2015].

Актинобактерии рода *Streptomyces* содержат наибольшее количество генов *aph*. Было высказано предположение о том, что данные гены передались им из штаммов-продуцентов антибиотиков. Ферменты из бактерий-продуцентов и клинических изолятов имеют общие функции, связанные с модификацией антибиотика, и высокую степень сходства на уровне аминокислотных последовательностей. Они имеют такой же мотив, который соответствует АТФ-связывающему сайту, и характерный структурный участок распознавания, который является специфическим для субстрата – антибиотика. Функции генов, аннотированных как *aph* в секвенированных геномах, в настоящее время недостаточно изучены и требуют дальнейшего исследования [Wright, 2019].

К настоящему времени по данным Protein Data Bank были получены 3D структуры белков Aph(3'): Aph(3')-Ia, Aph(3')-IIa, Aph(3')-IIIa для нативных ферментов, а также в комплексе с субстратами и ингибиторами эукариотических протеинкиназ [Fong et al., 2010; Stogios et al., 2013; Shi et al., 2013]. Остальные 3D структуры получены для других классов аминогликозидфосфотрансфераз клинических изолятов: Aph(2"), Aph(4), Aph(9) и Aph(7") [Fong et al., 2010; Stogios et al., 2011; Kaplan et al., 2016; Takenoya et al., 2019]. Проведенные структурные исследования продемонстрировали тесную эволюционную связь между генами модификации антибиотиков: гены аминогликозидфосфотрансфераз имеют общих предков с генами серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) [Leban et al., 2016].

Степень разработанности темы исследования

Ранее при изучении спектра устойчивости 110 штаммов рода *Streptomyces* к аминогликозидным антибиотикам было обнаружено, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 (продуцент окситетрациклина) обладает устойчивостью ко всем природным аминогликозидным антибиотикам в концентрации до 20 мкг/мл [Потехин и Даниленко, 1985]. В штамме *S. rimosus* ATCC 10970 была идентифицирована и охарактеризована аминогликозид-3'-фосфотрансфераза нового типа – AphVIII [Потехин и Даниленко, 1985; Sizova et al., 2002], установлена трехмерная структура фермента (код PDB 4H05) [Boyko et al., 2016]. При секвенировании генома в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 было выявлено 14 *aph* генов, включая *aphVIII*. Изучение функций этих генов и получение трехмерных структур позволит проводить сравнительный анализ их структур с известными структурами APH(3')-VIII и APH(3')-IIa и APH(3')-IIIa из клинических изолятов для последующего изучения механизмов устойчивости.

Цели исследования:

Изучение экспрессии и функций генов, аннотированных как аминогликозидтрансферазы, штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, и их вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам.

Задачи исследования:

1. Классификация Aph штамма *S. rimosus* ATCC 10970 на основании филогенетического родства с известными ранее аминогликозидфосфотрансферазами из клинических изолятов и штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков;
2. Клонирование представителей каждого класса *aph*-генов *S. rimosus* ATCC 10970 в *E. coli*, анализ их экспрессии в штаммах *E. coli*, исследование спектра и уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам;
3. Выделение рекомбинантных белков Aph *S. rimosus* ATCC 10970, исследование субстратной специфичности, анализ фосфотрансферазной активности и фосфорилирования субстратов;
4. Получение трехмерных структур белков Aph *S. rimosus* ATCC 10970;
5. Изучение экспрессии *aph*-генов при выращивании штамма *S. rimosus* в присутствии аминогликозидных антибиотиков;
6. Идентификация других генов, обуславливающих устойчивость штамма *S. rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам.

Научная новизна

Работа направлена на выявление и характеристику новых механизмов формирования резистентности к аминогликозидным антибиотикам посредством их ферментативной модификации аминогликозидтрансферазами, структурных особенностей и функциональных характеристик ферментов данной группы у представителей почвенных актинобактерий *Streptomyces rimosus*.

В штамме *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 впервые идентифицирован и биохимически охарактеризован новый ген *aph(3'')-Id*, кодирующий стрептомицин фосфотрансферазу. В рамках изучения свойств белка Aph(3'')-Id, впервые для аминогликозидфосфотрансфераз была продемонстрирована способность фермента подвергаться автофосфорилированию *in vitro*.

Получены трехмерные структуры белка Aph(3'')-Id *S. rimosus* ATCC 10970 в апо-форме и в комплексе со стрептомицином и АДФ с разрешением 1.17 и 1.65 Å соответственно. Данные структуры являются первыми для ферментов подсемейства Aph(3'').

Установлено и изучено влияние генов серин-треониновых протеинкиназ на повышение устойчивости *E. coli* к аминогликозидным антибиотикам при совместном клонировании гена аминогликозидфосфотрансферазы *aphSR2* и генов серин-треониновых протеинкиназ *pkSR1* и *pkSR2*, локализованных в одном кластере генома *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. Установлено, что в совместной конструкции *E. coli/aphSR2/pkSR1* происходит повышение уровня устойчивости к неомицину в 2 раза. AphSR2 является второй после Aph(3')-VIII аминогликозидфосфотрансферазой стрептомицетов, и, в частности, *S. rimosus* ATCC 10970, для которой полученные данные показывают, что уровень устойчивости повышается СТПК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предметом исследования диссертационной работы являются гены, аннотированные как аминогликозидтрансферазы штамма *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, устойчивого ко всем природным аминогликозидным антибиотикам в концентрации до 20 мкг/мл. В процессе изучения аминогликозидфосфотрансфераз данного штамма установлен новый механизм модуляции активности фермента посредством автофосфорилирования, эта способность сближает два класса ферментов: протеинкиназы и аминогликозидфосфотрансферазы.

Штаммы *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды с клонированными *aph* генами, разработанные методы выделения белков и выделенные рекомбинантные белки могут быть использованы в научно-исследовательских работах с последующим потенциальным применением в области практической медицины.

Получение пространственных структур аминогликозидфосфотрансфераз нового типа позволит проводить сравнительный анализ их структур с известными структурами APH(3')-VIII и APH(3')-IIa и APH(3')-IIIa из клинических изолятов, а также проводить отбор ингибиторов APH – потенциальных лекарственных препаратов.

Работа выполнялась в рамках РФФИ проект № 17-04-01106 от 6 апреля 2017 г.

Апробация работы

Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ФГБУН ИОГен РАН в 2015-2019 г. Автором опубликовано 5 статей по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах

данных Web of Science и Scopus. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях. Устный доклад был представлен на III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» XI съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров (ноябрь 2016 г., Минск, Республика Беларусь). Стеновые доклады были представлены на XIX и XXI Всероссийском Конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (июнь 2016 и 2018 г., Санкт-Петербург), Всероссийской конференции с международным участием "50 лет ВОГиС: успехи и перспективы" (ноябрь 2016 г., Москва), а также на международной конференции II International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, IC2AR (июнь 2017 г., Капарика, Португалия).

Промежуточные результаты диссертационной работы были представлены на лабораторном семинаре 03 октября 2019 г. Апробация диссертационной работы проведена 08 октября 2019 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Положения, выносимые на защиту

1. Аминогликозидфосфотрансферазы сходны по структуре и функциям с эукариотическими протеинкиназами и могут обладать способностью к автофосфорилированию.
2. Серин-треониновые протеинкиназы оказывают влияние на модуляцию уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам у бактерий рода *Streptomyces*.
3. Устойчивость к аминогликозидам у представителей рода *Streptomyces* может быть обусловлена не только аминогликозидфосфотрансферазами, но и другими ферментами, такими, как аминогликозид ацетилтрансферазами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. Boyko K.M., Gorbacheva M.A., Korzhenevskiy D.A., Alekseeva M.G., Mavletova D.A., Zakharevich N.V., Elizarov S.M., **Rudakova N.N.**, Danilenko V.N., Popov V.O. Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation. // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2016, V. 477, № 4, P. 595-601. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.097.

2. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы *Streptomyces rimosus*: структура, функции, вклад в

устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. // Проблемы медицинской микологии, 2016, Т. 18, № 2, стр. 109.

3. Алексеева М.Г., **Рудакова Н.Н.**, Захаревич Н.В., Мавлетова Д.А., Бойко К.М., Николаева А.Ю., Корженевский Д.А., Даниленко В.Н. Новый ген аминогликозидфосфотрансферазы *aph(3'')-Id* из *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, кодирующий устойчивость к стрептомицину. // Генетика, 2018, Т.54, № 10, с. 1–5.

4. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Изучение распространения, структуры и функций аминогликозидфосфотрансфераз у микроорганизмов рода *Streptomyces*. // Проблемы медицинской микологии, 2018 г, Т. 20, № 2, стр. 109.

5. Alekseeva M.G., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Mavletova D.A., **Rudakova N.N.**, Zakharevich N.V., Korzhenevskiy D.A., Ziganshin R.H., Popov V.O., Danilenko V.N. Identification, functional and structural characterization of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(3'')-Id from *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. // Arch. Biochem. Biophys., 2019, V. 671, № 4, P. 111-122. doi: 10.1016/j.abb.2019.06.008.

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

1. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы *Streptomyces rimosus*: структура, функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XIX Кашкинские чтения). 14-16 июня 2016 г., Санкт-Петербург, Россия, с. 109. Постерный доклад

2. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Изучение структуры и функций аминогликозидфосфотрансфераз штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. // Всероссийская конференция с международным участием "50 лет ВОГиС: успехи и перспективы". 08-10 ноября 2016 г., Москва, Россия, с. 270. Постерный доклад

3. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Ватлин А.А., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы актинобактерий: структура и функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам у возбудителей туберкулеза и актиномикозов. // III Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» XI съезд Белорусского общества генетиков и

селекционером. 23–25 ноября 2016 г., Минск, Республика Беларусь, с. 36. **Устный доклад Рудаковой Н.Н.**

4. **Rudakova N.N.**, Alekseeva M.G., Zakharevich N.V., Mavletova D.A., Elizarov S.M., Shur K.V., Danilenko V.N. The study of distribution and functions of aminoglycoside phosphotransferases from soil microorganisms of the genus *Streptomyces*. // II International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, IC2AR. 12-15 июня 2017, Капарика, Португалия, с. 228-229. Постерный доклад

5. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Изучение распространения, структуры и функций аминогликозидфосфотрансфераз у микроорганизмов рода *Streptomyces*. // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения). 6-8 июня 2018 г., Санкт-Петербург, Россия, с. 109. Постерный доклад

Глава 1. Обзор литературы

Глава 1.1. Актинобактерии рода *Streptomyces* как резервуар генов лекарственной устойчивости

Использование различных лекарственных соединений для поддержания или улучшения здоровья человека является столь же старым по времени, как и письменная история. В связи с этим фактом, открытие и разработка лекарств для лечения заболеваний, вызванных бактериями, считается одним из самых значительных медицинских достижений XX века, в результате которого были спасены миллионы человеческих жизней. В настоящее время природные антибиотики были и остаются основой лечения многих заболеваний [Takahashi and Nakashima, 2018]. Широкий и разнообразный спектр первичных и вторичных метаболитов, обладающих мощной, а иногда и уникальной биологической активностью, в сочетании с огромным и пока еще относительно неиспользованным потенциалом антибиотических препаратов обеспечивает важность и актуальность изучения как самих антибиотиков, так и их свойств [Berdy, 2012].

Возможность передачи устойчивых генетических элементов между бактериями в смешанных популяциях добавляет множество дополнительных и сложных потенциальных путей распространения генов устойчивости к антибиотикам [McArthur et al., 2013; Wooldridge, 2012]. По данным Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) в настоящее время насчитывается 13 293 генов устойчивости (<https://ardb.cbc.umd.edu/index.html>). При этом исследование устойчивости к антибиотикам перешло от сосредоточения внимания на отдельных патогенных организмах до изучения устойчивости к антибиотикам у патогенных и комменсальных бактерий на уровне микробных сообществ, а масштаб исследований становится междисциплинарным [Crofts et al., 2017].

1.1.1. Понятие резистом

Гены устойчивости к антибиотикам гипотетически берут начало в бактериях - продуцентах антибиотиков, относящихся к роду *Streptomyces* [Ogawara, 2016; Wright, 2019]. Стрептомицеты – грамположительные актинобактерии, которые являются продуцентами широкого спектра антимикробных соединений и значительным резервуаром устойчивости к антибиотикам в почвах [Schlatter and Kinkel, 2015].

Генетический контроль природной устойчивости к антибиотикам определяется совокупностью генов резистома [Davies and Wright, 1997]. Установлено, что компоненты резистома развивались задолго до клинического применения антибиотиков. Для преодоления проблемы устойчивости к антибиотикам комбинируют достижения в области секвенирования

генома нового поколения, биоинформатики и аналитической химии, что позволяет проводить идентификацию более 20-30 кластеров генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам [Perry et al., 2014; Bengtsson-Palme et al., 2017; Terence et al., 2017]. Устойчивость к антибиотикам кодируется несколькими генами, многие из которых могут передаваться между бактериями [Blair et al., 2015].

Термин «резистом» впервые введен в лаборатории под руководством Дж. Райта с целью характеристики совокупности генов и механизмов устойчивости к антибиотикам у бактерий [D'Costa et al., 2006; Wright, 2007].

Согласно классификации Дж. Райта, выделяют следующие группы генов резистома:

- Гены антибиотикорезистентности клинических штаммов бактерий. Изучение генов, относящихся к данной группе, представляет наибольший научный интерес.
- Гены антибиотикорезистентности штаммов – продуцентов антибиотиков. У представителей данной группы выявлены уникальные механизмы устойчивости к антибиотикам
- Молчащие гены антибиотикорезистентности. Уровень экспрессии генов, относящихся к данной группе, низкий или не отмечается.
- Гены протеорезистентности. Для генов этой группы не показано непосредственное влияние на устойчивость к антибиотикам. Тем не менее, эти гены могут кодировать ферменты, влияющие на повышение общего уровня устойчивости анализируемой бактериальной культуры [Wright, 2010].

Механизмы антибиотикорезистентности будут подробно рассмотрены в разделе 1.3.

1.1.2. Общая информация об актинобактериях рода *Streptomyces*

Актинобактерии представляют собой одну из крупнейших бактериальных фил и являются широко распространенными в водных и наземных экосистемах. Большинство из представителей этой группы бактерий являются сапрофитными, обитающими в почве микроорганизмами, но они встречаются и в пресной, и в соленой воде, а также в воздухе. Они обычно присутствуют в почве при плотностях в количестве от 10^6 до 10^9 клеток бактерий на грамм почвы, причем стрептомицеты составляют более 95% всех штаммов актиномицетов, выделенных из почвы [Barka et al., 2015]. Некоторые актинобактерии являются возбудителями заболеваний человека и животных: *Actinomyces israelii* является возбудителем актиномикоза. *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces neuui*, *Actinomyces turicensis* являются возбудителями

заболеваний, локализующихся в различных частях тела, ротовой полости, кожных покровов, слизистых [Kononen and Wade, 2015].

Streptomyces – самый большой род актиномицетов. К нему относятся грамположительные аэробные бактерии, образующие сеть разветвленных нитей, субстратный и воздушный мицелий. На сегодняшний день насчитывается около 843 видов и 38 подвидов рода *Streptomyces* (LPSN, <http://www.bacterio.net/streptomyces.html>). Клеточная стенка стрептомицетов содержит аланин, глутаминовую кислоту, глицин и 6-диаминапимелиновые кислоты (LL-DAP). Их ДНК отличается высоким содержанием гуанина и цитозина, причем в наиболее широко изученных видах, например *Streptomyces coelicor*, содержание G + C составляет до 72,1% [Bentley et al., 2002]. Бактерии рода *Streptomyces* наиболее широко распространены в таких средах как почва и морская вода [Siti et al., 2017]. Стрептомицеты являются самым крупным родом бактерий, для которых установлена способность синтезировать антибиотики. Данное свойство применяется с 1940х г.г. в области промышленного производства антибиотиков [Newman and Cragg, 2007].

Хотя стрептомицеты рассматриваются преимущественно как свободно живущие наземные почвообразующие бактерии, некоторые виды являются симбионтами с грибами, насекомыми, растениями и животными [Seipke et al., 2012], и некоторые штаммы обитают в морских почвах [Fiedler et al., 2005]. Несколько видов стрептомицетов являются растительными патогенами и вызывают болезни, поражая корни и клубни [Zhang and Loria, 2017]. Наиболее экономически важное заболевание, вызванное представителями рода *Streptomyces* – картофельная парша, характеризующаяся поверхностными поражениями клубней картофеля [Loria et al., 2006]. Еще один патогенный вид, *S. ipomoeae*, вызывает почвенную гниль на сладком картофеле [Tomihama et al., 2016]. К другим патогенным видам стрептомицетов относятся: *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. niveiscabiei*, *S. reticuliscabiei* и *S. caviscabies* [Goyer et al. 1996; Bouček-Mechiche et al., 2000; Park et al. 2003]. Многочисленные исследования представителей данного рода показали, что их можно встретить почти во всех экосистемах нашей планеты, при этом они успешно конкурируют с представителями других филогенетических групп за счет их необычного метаболизма и вторичных метаболитов, доминируя в микробной популяции [Berdy, 2012].

Многие представители рода *Streptomyces* хорошо изучены, поскольку являются коммерчески значимыми продуцентами вторичных метаболитов и гидролитических ферментов. Одним из таких штаммов является *Streptomyces lividans*, классический объект молекулярно-генетических исследований, а также используемый для получения гомологичных и

гетерологичных гидролитических ферментов для промышленного применения. В связи с коммерческой ценностью штамма, его метаболические пути и механизмы секреции некоторых веществ изучены очень подробно [Gullon and Mellado, 2018].

Развитие технологий, связанных с секвенированием геномов и анализом библиотек данных, а также вычислительных ресурсов компьютерной техники, ускоряет и упрощает идентификацию многочисленных кластеров генов биосинтеза природных лекарственных соединений (BGCs) в геномах стрептомицетов. Однако большинство этих BGC-кластеров являются молчащими или экспрессируются в исходных штаммах на невысоком уровне, что делает актуальным их исследование при помощи редактирования генома. Соответственно, разрабатываются многочисленные стратегии, в том числе, с применением (CRISPR) / CRISPR (Cas) технологий. Данный метод редактирования геномов обладает более высокой точностью по сравнению с другими методиками и более высокой эффективностью для редактирования генома в различных модельных организмах, включая стрептомицетов [Tao et al., 2014; Cobb et al., 2015].

Кроме того, многие штаммы стрептомицетов являются перспективными источниками новых антибиотиков против штаммов с множественной/широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ), в том числе, таких как метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus*. Ранее стрептомицеты уже были источниками таких антибиотиков, в частности, ванкомицина. За прошедшие годы количество новых антибиотических соединений значительно уменьшилось, в результате чего было меньше количество лекарственных соединений дошло до этапа клинических испытаний. Хотя за время исследований, начиная с обнаружения стрептомицина в 1944 году, было выявлено более 10400 биологически активных веществ у *Streptomyces*. При этом, поиск новых антибиотиков замедляется, а темп образования устойчивости к ним возрастает, что делает актуальным поиск новых антибиотиков и их продуцентов из необычных мест обитания [Verdy, 2012]. Для этой цели в первую очередь рассматриваются штаммы из малоизученных регионов, таких как мангровые заросли, пустыни, морские и пресноводные резервуары и эндофитные формы. Микроорганизмы, населяющие данные регионы, сталкиваются со сложными условиями окружающей среды, высокой соленостью, повышенными температурами, низкой влажностью. Данные штаммы стрептомицетов обладают уникальным метаболизмом и образуют уникальные биологически активные соединения [Kemung et al., 2018].

1.1.3. Штаммы *Streptomyces rimosus*

С начала 1960х г.г. группа ученых из исследовательского института PLIVA, Хорватия, работала с линиями двух независимо выделенных штаммов *Streptomyces rimosus*. Первый штамм, *S. rimosus* R7 (ATCC 10970, NRRL 2234) из Американской коллекции микроорганизмов, встречается в большинстве публикаций. Второй штамм, *S. rimosus* R6, выделен из почвы сотрудниками факультета пищевой технологии и биотехнологии Загребского института и в дальнейшем использован для получения мутантов для коммерческого производства окситетрациклина [Rincon et al., 2018].

S. rimosus R6-500 является селекционно полученным промышленным штаммом, который производит значительное количество окситетрациклина. В результате явления генетической нестабильности, свойственного многим стрептомицетам, был получен штамм *S. rimosus* R6-500-MV9, отличающийся делецией *otc*-кластера [Gravius et al., 1993]. Однако более подробный генетический анализ штамма *S. rimosus* R6-500-MV9 показал, что “удаленные” последовательности присутствовали в небольшом количестве копий, примерно 1 на 1000 копий хромосомы. Штамм *S. rimosus* R6-500-MV9-R8 содержит нормальное число копий *otc*-кластера [Denapaite et al., 2005].

Три геномные последовательности были аннотированы в NCBI – штамма R6-500 и двух его мутантов. При сравнении последовательности штамма R6-500 с аннотированной ранее последовательностью штамма *S. rimosus* R7 была выявлена их идентичность более 99%, из чего можно предположить, что штамм *S. rimosus* R6-500 является производным от R6-500. Однако два этих штамма отличаются участком генома, размер которого составляет около 600 kb, штамм *S. rimosus* R6-500 характеризуется отсутствием данного участка. В свою очередь, штамм R6-500-MV9 отличается от штамма R6-500 отсутствием участка генома размером 650 kb, включающим в свой состав *otc*-кластер. Штамм R6-500-MV9-R8 имеет на 190 kb больший размер генома, по сравнению с предшественником [Baranasic et al., 2014].

Штамм *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 является продуцентом окситетрациклина. Особенности организации генома данного штамма являются линейные хромосомы с высоким содержанием G/C пар (71.4%), гены, отвечающие за основной метаболизм клетки и важные для функционирования клетки системы, находятся в основном в центральной части хромосомы, так как концевые участки хромосом менее консервативны. Размер генома: 10.4 Mb. Плазмиды встречаются как линейные, так и кольцевые. Наиболее распространенными профагами являются актинофаги RP2 и RP3 [Petkovic et al., 2006].

Глава 1.2. Аминогликозидные антибиотики

Аминогликозиды (аминоциклитолы) представляют собой большую группу водорастворимых антибиотиков, обладающих широким антимикробным спектром активности [Wright 1999; Chandrika and Garneau-Tsodikova, 2018]. Молекула аминогликозидного антибиотика содержит два или более аминсахара, которые связаны гликозидными связями с аминоциклитольным кольцом [Busscher et al., 2005]. Также к аминогликозидам относят спектиномицин, в молекуле которого между аминоциклитольным кольцом и аминсахаром нет связей [Bryskier, 2005; Veyssier and Bryskier, 2005].

Аминогликозидные антибиотики обладают бактерицидным действием, механизм которого заключается в связывании аминогликозида с декодирующим сайтом рибосомы и нарушением синтеза белков [Hermann, 2005; Sutcliffe, 2005; Hermann, 2007].

К аминогликозидным антибиотикам относятся: стрептомицин, канамицин, неомицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин и др. Выделяют три поколения аминогликозидных антибиотиков, представленные в таблице 1 [Решедько, 1999; Hotta and Kondo, 2018].

Таблица 1. Поколения аминогликозидных антибиотиков.

I поколение	II поколение	III поколение
Стрептомицин	Гентамицин	Амикацин
Канамицин	Тобрамицин	Исепамицин
Неомицин	Сизомицин	
Мономицин	Нетилмицин	
Паромомицин		

* Данные в таблице приведены в соответствии с классификацией, представленной в работах [Krause et al., 2016; Hotta and Kondo, 2018]

В настоящее время новейшим аминогликозидным антибиотиком является плазомицин, полусинтетическое производное сизомицина. В настоящее время препарат на основе плазомицина находится на стадии клинических испытаний [Shaeer et al., 2019; Serio et al., 2019].

Классификация, спектр активности, токсичность, механизм действия и другие свойства аминогликозидных антибиотиков подробно рассмотрены далее в разделе 1.2.

1.2.1. Химическое строение

Аминогликозиды относятся к группе углеводов антибиотиков. Молекула аминогликозидного антибиотика содержит два или более аминсахара, которые связаны гликозидными связями с аминциклитольным кольцом. Графическое изображение химической структуры аминогликозидных антибиотиков представлено на рисунке 1 [Shi et al., 2013].

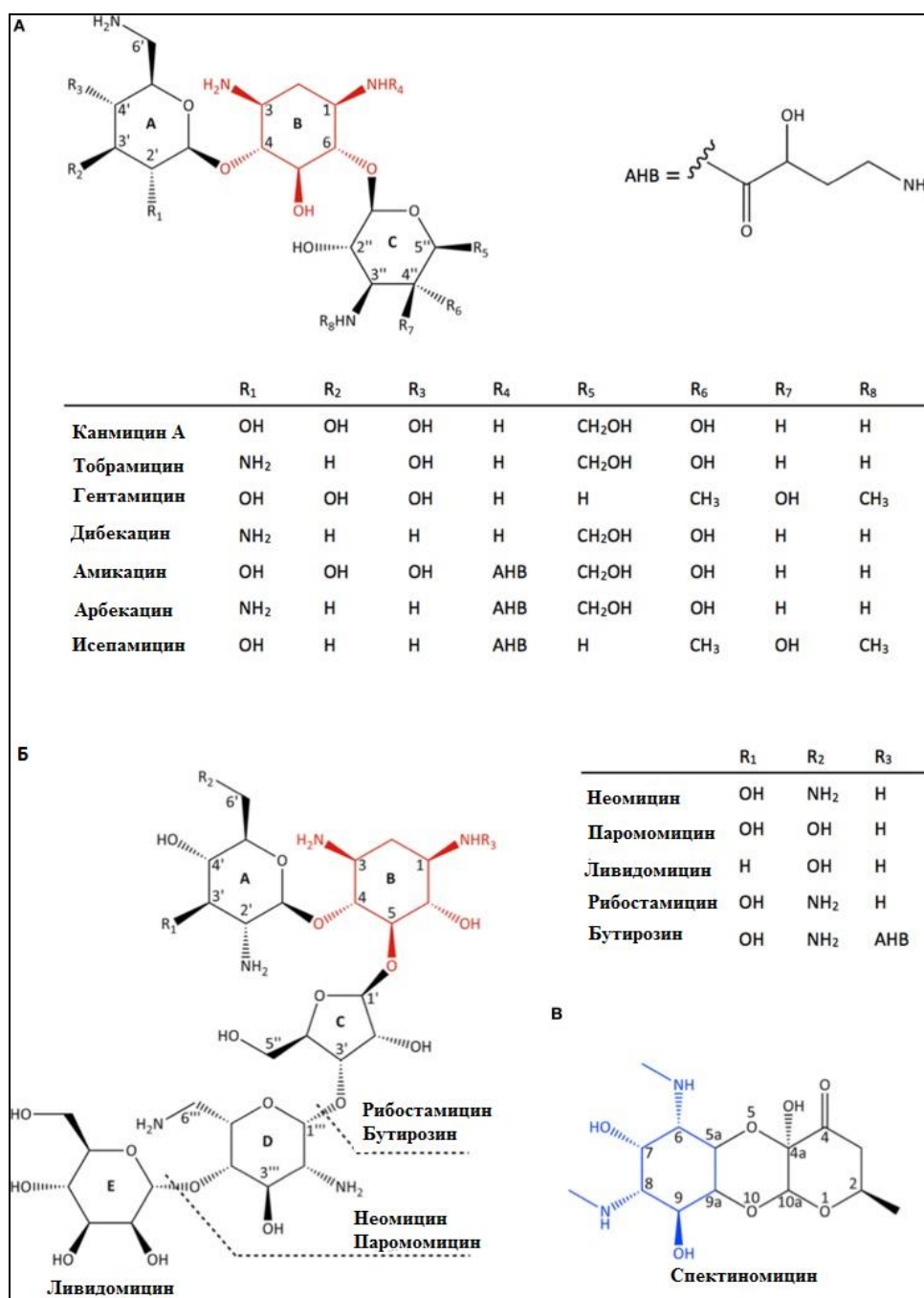


Рисунок 1. Химическая структура разных групп аминогликозидов [Shi et al., 2013].

А – 4,6-двузамещенные аминогликозиды; Б – 4,5-двузамещенные; В – спектиномицин. Красным цветом выделены 2-дioxистрептаминовые ядра, а голубым цветом – стрептаминовое ядро.

При нейтральных значениях pH аминокликозиды представляют собой положительно заряженные молекулы, обладающие высокой афинностью к нуклеиновым кислотам, особенно к прокариотической рибосомальной РНК [Davies and Wright, 1997; Busscher et al., 2005; Magalhaes and Blanchard, 2009].

1.2.2. История открытия

Открытие первого аминокликозидного антибиотика, стрептомицина, было сделано в 1943 году научной группой под руководством З. Ваксмана [Waksman, 1963]. Стрептомицин был первым антибиотиком, открытым в результате тщательно спланированного научного поиска. Открытие пенициллина побудило З. Ваксмана и его сотрудников к изучению почвенных актиномицетов и в 1943 г. был выделен штамм *Streptomyces griseus*, продуцент стрептомицина [Forge, Schacht, 2000]. Стрептомицин до сих пор используют для лечения туберкулеза [Menzies et al., 2009]. Позднее были открыты и другие аминокликозиды – неомицин (1949), продуцируемый почвенным микроорганизмом *Streptomyces fradiae*, и канамицин (1957), продуцентом которого является *Streptomyces kanamyceticus* [Ramirez and Tolmasky, 2017].

1.2.3. Спектр активности аминокликозидов

Аминокликозидные антибиотики обладают широким антибактериальным спектром действия [Kotra et al., 2000; Vakulenko and Mobashery, 2003; Houghton et al., 2010; Serio et al., 2017]. Аминокликозиды обладают бактерицидным действием, характеризующееся тем, что под влиянием антибиотика наступает гибель микроорганизмов. Эффективность действия аминокликозидов зависит от концентрации [Forge, Schacht, 2000; Silva and Carvalho, 2007]. По отношению к концентрации аминокликозидов, вызывающей гибель клеток, микроорганизмы делятся на следующие группы [Егоров, 2004]:

- высокочувствительные – выдерживают концентрацию до 10 мкг/мл (представители родов *Bacillus*, *Brucella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*);
- умеренночувствительные – выдерживают концентрацию от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл (представители родов *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Vibrio*);
- устойчивые – выдерживают концентрацию свыше 100 мкг/мл (все остальные микроорганизмы, в т.ч. представители родов *Bacteroides*, *Clostridium* и др).

1.2.4. Молекулярный механизм действия аминокликозидных антибиотиков

Антибактериальное действие аминокликозидов опосредовано их химической структурой. Поскольку аминокликозидные антибиотики содержат значительное количество

положительно заряженных группировок, они обладают высоким сродством к отрицательно заряженным молекулам, таким как нуклеиновые кислоты [Jana and Deb, 2006].

Рибосомы являются одной из основных мишеней действия антибиотиков в бактериальной клетке. Большая часть используемых в клинической практике антибиотиков ингибирует стадию элонгации в процессе синтеза белка: аминогликозиды, хлорамфеникол, линкозамиды, макролиды, оксазолидиноны, стрептограммины и тетрациклины. Несмотря на большой размер рибосом, антибиотики взаимодействуют только с несколькими сайтами. Антибиотики, взаимодействующие с 30S субъединицей, связываются либо с Р-сайтом, либо с А-сайтом [Ogle et al., 2003; Vicens and Westhof, 2003; Ogle and Ramakrishnan, 2005; Zaher and Green, 2009; Wilson, 2014].

Основной мишенью аминогликозидных антибиотиков является малая субъединица бактериальной рибосомы (30S), в состав которой входит 21 белок и 16S рРНК. Аминогликозиды связываются с 16S рибосомальной РНК, а точнее с А-сайтом, что приводит к нарушению трансляции при синтезе белка [Fourmy et al., 1996; Carter et al., 2000; Ramirez and Tolmashy, 2010]. Модель молекулярного взаимодействия аминогликозидных антибиотиков с А-сайтом была подробно изучена при помощи метода рентгеноструктурного анализа [Magnet and Blanchard, 2005].

Точность трансляции зависит от двух этапов – первичного взаимодействия между кодоном (мРНК) и антикодоном (тРНК), и последующей правильности считывания генетической информации [Jana and Deb, 2006]. А-сайт является декодирующим сайтом рибосомы, то есть именно в А-сайте рибосомы происходит непосредственное взаимодействие кодона с антикодоном и стабилизация данного конъюгата. При взаимодействии молекулы аминогликозида с А-сайтом происходит изменение структуры сайта. Комплекс аминогликозид/А-сайт распознается как комплекс правильный кодон/антикодон, нарушается правильность считывания генетической информации, образуются неправильно функционирующие белки [Bakker, 1992; Busse et al., 1992; Mehta and Champney, 2003; Vakulenko and Mobashery, 2003; Magnet and Blanchard, 2005]. Таким образом, аминогликозидные антибиотики обладают бактерицидным действием, механизм которого заключается в связывании аминогликозида с декодирующим сайтом рибосомы и нарушении синтеза белков. В результате происходит образование неправильно функционирующих белков и гибель клеток [Block and Blanchard, 2019].

1.2.5. Применение аминогликозидов

Аминогликозиды являются одними из первых открытых и использованных в клинической практике антибиотиков. Однако их применение значительно сократилось из-за появления других антибиотиков широкого спектра действия, обладающих меньшим количеством побочных эффектов. Но на данный момент, в связи с резко возрастающим количеством инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, область терапевтического применения аминогликозидов возросла [Becker and Cooper, 2013]. Аминогликозидные антибиотики широко применяют при лечении различных тяжелых инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными микроорганизмами [Hermann, 2007]. Аминогликозиды используют при лечении туберкулеза, туляремии, чумы, пневмонии, бруцеллеза, эндокардитов, стафилококковых и нозокомиальных инфекции [Yao and Moellering, 2007; Poulidakos and Falagas, 2014].

Изучение молекулярных механизмов действия аминогликозидов, которое началось с середины 1990-х, способствовало появлению и развитию новых областей применения аминогликозидных антибиотиков. Обсуждается возможность использования аминогликозидов для лечения генетических заболеваний, таких как муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшена и мукополисахаридоз первого типа [Kellermayer, 2006; Zingman et al., 2007]. Также было показано, что аминогликозиды способны индуцировать выработку ретроциклинов, что делает возможным разработку средств для профилактики ВИЧ на основе аминогликозидов [Venkataraman, 2009].

1.2.6. Токсичность аминогликозидных антибиотиков

Аминогликозиды обладают высокой токсичностью, что значительно сужает спектр их применения, поэтому аминогликозидные антибиотики применяются для лечения только тяжелых инфекционных заболеваний [Zarate et al., 2018]. Многие аминогликозидные антибиотики обладают ототоксичностью и нефротоксичностью [Selimoglu, 2007]. Аминогликозиды не разрушаются в организме человека, а лишь выводятся из него. При накоплении выше определенной концентрации аминогликозиды вызывают нарушения вестибулярного и слухового аппарата, обратимое нарушение функций почек. В редких случаях также могут наблюдаться аллергические реакции разной степени тяжести, вплоть до анафилактического шока [Forge and Schacht, 2000; Bates, 2003; Rybak and Whitworth, 2005].

1.2.7. Продуценты аминогликозидов

Наибольшее число антибиотиков (не менее 70 %), широко применяемых на практике, относится к веществам, образуемым актиномицетами (порядок *Actinomycetales*). Продуцентами наиболее значимых аминогликозидных антибиотиков являются представители рода *Streptomyces* [Block and Blanchard, 2019]. Продуценты различных аминогликозидов представлены в таблице 2 [Wright et al., 1998].

Таблица 2. Продуценты аминогликозидных антибиотиков.

Название антибиотика	Штамм-продуцент
Канамицин	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> ATCC 12853 [Nepal et al., 2009]
Стрептомицин	<i>Streptomyces griseus</i> C-96 [Takahashi and Nakashima, 2018]
Гентамицин	<i>Micromonospora purpurea</i> ATCC 31164 [Li et al., 2013]
Спектиномицин	<i>Streptomyces spectabilis</i> ATCC 27741 [Thapa et al., 2008]
Бутирозин	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 21557 [Ota et al., 2000]
Тобрамицин	<i>Streptomyces tenebrarius</i> , <i>Streptomyces cremeus</i> subsp. <i>nebramycini</i> [Motkova et al., 1984]
Неомицин	<i>Streptomyces fradiae</i> NCIM 2418 [Vastrad and Neelagund, 2014]
Амикацин	Полусинтетическое производное канамицина
Исепамицин	Полусинтетическое производное гентамицина В

Глава 1.3. Механизмы устойчивости к аминогликозидным антибиотикам

Существуют несколько разных механизмов, обуславливающих устойчивость бактерий к воздействию антибиотиков, которые могут осуществляться одновременно в одной бактериальной клетке [Taber et al., 1987; Magnet and Blanchard, 2005; Tolmasky, 2007; Alekshun and Levy, 2007; Houghton et al., 2010]. Первым из них является предотвращение взаимодействия антибиотика с мишенью, которое может происходить путем модификации мишени или путем перестройки путей биосинтеза. Вторым механизмом является активный транспорт антибиотика из клетки при помощи ассоциированных с мембраной белков-транспортеров. Основой третьего механизма устойчивости является разрушение или модификация функциональных групп антибиотиков: синтез ферментов, селективно взаимодействующих с антибиотиками и угнетающих их активность [Morar and Wright, 2010; Ali et al., 2018]. Все описанные механизмы устойчивости требуют перестройки генетической информации клетки в

ответ на присутствие в среде антибиотика, что приводит к значительным энергетическим затратам [Alanis, 2005; Wright and Poinar, 2012].

1.3.1. Устойчивость бактерий к антибиотикам путем модификации мишеней

Изменение в микробной клетке сайтов мишени, ответственной за чувствительность микроорганизма к антибиотику, является одним из самых распространенных механизмов приобретения устойчивости. Примеры штаммов, обладающих данным типом устойчивости, могут быть найдены для каждой группы антибиотиков [Erand et al., 2016]. Модификация сайта мишени чаще всего является результатом спонтанных мутаций хромосомных генов и положительной селекции в присутствии антибиотика. Например, спонтанные мутации в генах, кодирующих РНК-полимеразу и ДНК-гиразу, приводят к устойчивости к рифампицилину и антибиотикам-хинонам соответственно [Willmott and Maxwell, 1993; Heep et al., 2000]. В других случаях приобретение устойчивости к антибиотику происходит вследствие переноса генетической информации (конъюгация, трансдукция, трансформация) от устойчивого штамма к чувствительному [Lambert, 2005]. К данному механизму устойчивости также относится метилирование рибосомального сайта связывания антибиотика, а также возникновение мутаций в сайте связывания [O'Connor et al., 1991; Recht and Puglisi, 2001; Galimand et al., 2005; Doi and Arakawa, 2007].

1.3.2. Активный транспорт антибиотика из клетки и уменьшение проницаемости мембраны

Бактериальные системы активного транспорта антибиотиков из клетки обеспечивают энергозависимый выброс большого числа разнообразных по химической структуре соединений, не изменяя при этом их структуру и не разрушая их. Установлено, что белки-транспортёры антибиотиков составляют 6%-18% от всех транспортных белков бактериальной клетки [Paulsen et al., 1998; Aires et al., 1999; Rosenberg et al., 2000; Magnet et al., 2001].

Белки-транспортёры антибиотиков в настоящее время подразделяются на 5 семейств: MFC, ABC, SMR, RND, MATE [Kumar and Schweizer, 2005]. Грамотрицательные бактерии имеют ассиметричную внешнюю мембрану, непроницаемую для многих химических соединений. Транспорт антибиотиков через наружную мембрану грамотрицательных бактерий может происходить посредством пориновых каналов, диффузии через бислои и более сложными путями. Устойчивость к антибиотикам может возникать вследствие изменения состава мембраны [Poole, 2005; Wright, 2005; Ghai et al., 2018].

Для этого механизма антибиотикорезистентности характерна устойчивость сразу к нескольким аминогликозидам, тем не менее, уровень модулируемой устойчивости, как правило, невысокий. Кроме того, микробные клетки с нарушенной системой транспорта антибиотиков часто имеют метаболические нарушения различного характера и отличаются медленным ростом [Hancock, 1981; MacLeod et al., 2000; Over et al., 2001; Walmsley, 2001].

1.3.3. Ферментативная модификация и деградация антибиотика в клетке

Устойчивость бактерий к антибиотикам может возникать вследствие синтеза ферментов, селективно действующих на антибиотики и нарушающих их активность [Wright, 2005]. При этом, среди всех известных механизмов устойчивости к аминогликозидам, модификация ферментами является наиболее распространенным [Wright, 1999].

Ферменты, модифицирующие аминогликозиды, катализируют реакции модификации различных -ОН и -NH₂ групп 2-диоксистрептаминового ядра или остатков сахаров. К ним относятся нуклеотидилтрансферазы (аденилилтрансферазы), фосфотрансферазы и ацетилтрансферазы [Wright and Thompson, 1999; Vetting et al., 2005; Hermann, 2007]. Каждая из трех групп ферментов, модифицирующих аминогликозидные антибиотики, представлена несколькими изоферментами, отличающимися положением модифицируемых в молекуле антибиотика функциональных групп. Ацетилтрансферазы (ААС) модифицируют аминокетильную группу молекулы аминогликозида, фосфотрансферазы (АРН) и аденилилтрансферазы (АНТ) действуют на гидроксильную группу. Действие аминогликозидмодифицирующих ферментов (соответственно ацетилирование, фосфорилирование и аденилирование) приводит к такому изменению структуры молекулы антибиотика, которое не позволяет ему связываться с бактериальной рибосомой, в результате синтез белка не ингибируется, и бактериальная клетка сохраняет жизнеспособность [Shaw et al., 1993]. Ферменты, модифицирующие аминогликозиды, как правило, являются монофункциональными. Однако, среди них встречаются и бифункциональные ферменты, имеющие две разные аминогликозид-модифицирующие активности, например ААС-6+АРН-2 [Zhang et al., 2009].

Для работы ацетилтрансфераз в качестве кофактора необходим ацетил-КоА, а для работы фосфо- и аденилил-трансфераз необходим донор остатков фосфорной или адениловой кислот, которым является аденозинтрифосфат (АТФ). Механизм реакций ферментативных модификаций аминогликозидов представлен на рисунке 2 [Magalhaes and Blanchard, 2009].

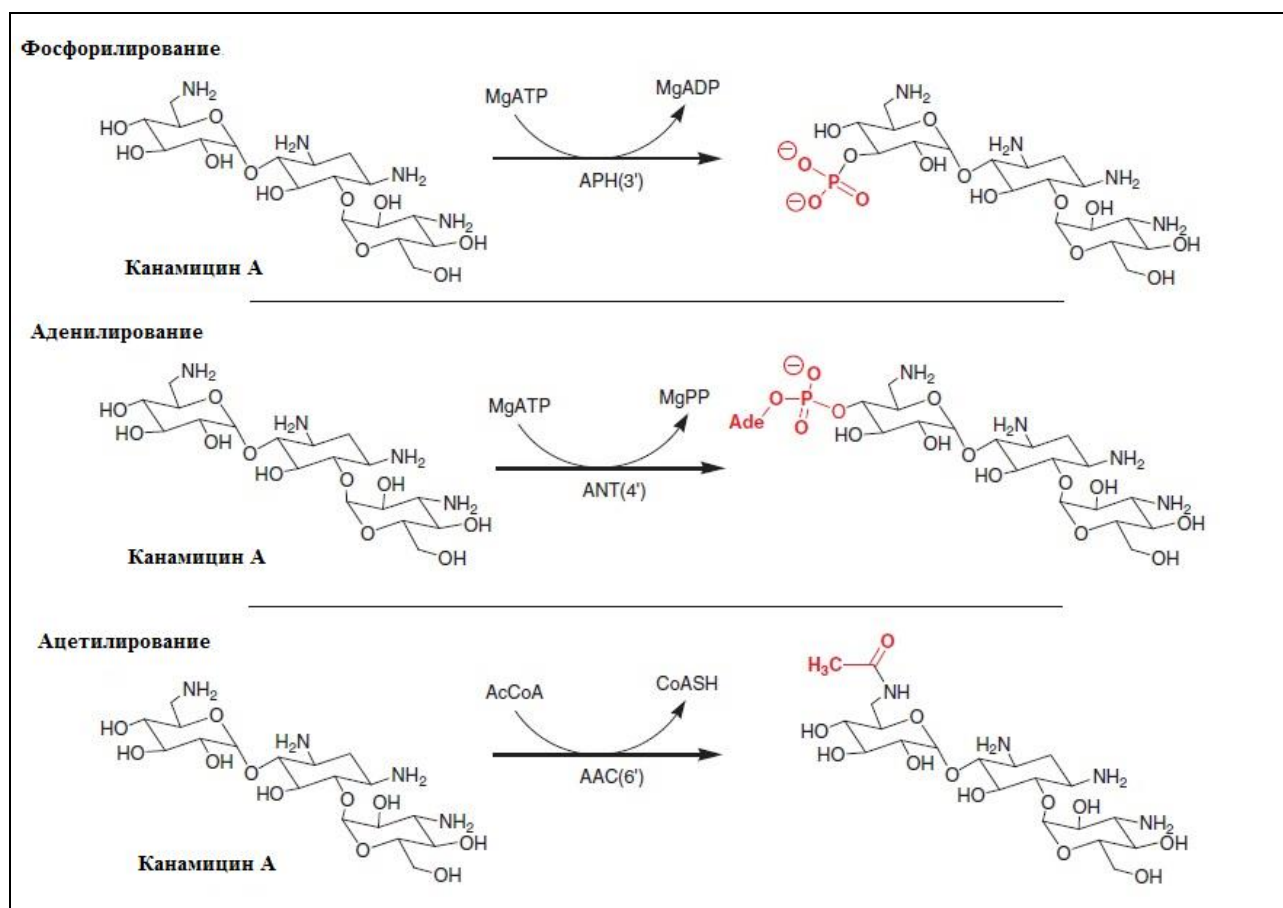


Рисунок 2. Механизмы реакций ферментативной модификации аминогликозидных антибиотиков [Magalhaes and Blanchard, 2009].

Глава 1.4. Аминогликозидфосфотрансферазы

Аминогликозидфосфотрансферазы – это ферменты, модифицирующие аминогликозидные антибиотики путем фосфорилирования их гидроксильных групп в присутствии АТФ [Smith and Baker, 2002]. Ранее считалось, что донором фосфатной группировки является только АТФ, но недавно было установлено, что несколько фосфотрансфераз используют ГТФ вместо АТФ [Shakya and Wright, 2010; Shi and Berghuis, 2012; Smith et al., 2012].

1.4.1. Семейство аминогликозидфосфотрансфераз

Семейство аминогликозидфосфотрансфераз включает в себя множество ферментов, значительно различающихся по нуклеотидным последовательностям, субстратной специфичности и положению модифицируемой ОН-группы молекулы антибиотика [Toth et al., 2009; Frase et al., 2012; Stogios et al., 2013].

Проведено множество исследований молекулярной структуры аминогликозидфосфотрансфераз, механизмов их взаимодействия с аминогликозидными антибиотиками и нуклеотидными субстратами [Hon et al., 1997; Burk et al., 2001; Fong and Berghuis, 2002; Nurizzo et al., 2003; Fong and Berghuis, 2009; Young et al., 2009; Fong et al., 2010; Toth et al., 2010; Stogios et al., 2011]. На данный момент получено более 30 трехмерных структур аминогликозидфосфотрансфераз из 5 подсемейств, для Aph(3'), Aph(2''), Aph(4), Aph(9) и Aph(7). Для ферментов подсемейств Aph(3'') и Aph(6) 3D структуры не были получены [Zarate et al., 2018; Takenoya et al., 2019].

Механизм фосфотрансферной реакции

Существует два возможных механизма протекания реакции фосфорилирования, катализируемой аминогликозидфосфотрансферазами: диссоциации и ассоциации, представленные на рисунке 3. Два типа молекул, участвующих в реакции, АТФ и аминогликозидный антибиотик, занимают определенные положения в активном центре фермента. Перенос фосфата катализируется ферментом и является одноэтапным процессом. В случае механизма ассоциации, перенос фосфата описывается термином «одновременное взаимодействие в каталитическом центре фермента», а в отношении механизма переноса фосфата по типу диссоциации используется термин «поочередное взаимодействие в каталитическом центре фермента» [Kim and Mobasheri, 2005].

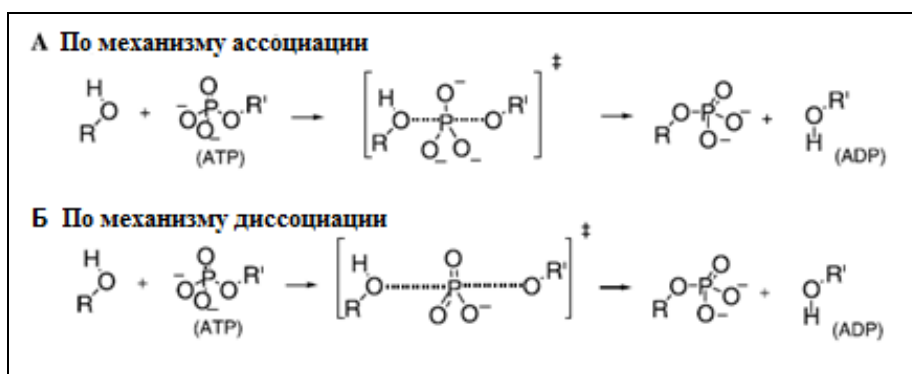


Рисунок 3. Механизмы фосфотрансферной реакции [Kim and Mobashery, 2005].

А – схема реакции согласно механизму ассоциации;

Б – схема реакции согласно механизму диссоциации.

Аминогликозидфосфотрансферазы обеспечивают устойчивость к широкому спектру аминогликозидов, большинство из которых являются слабыми ингибиторами этих ферментов. Механизм субстратного ингибирования на данный момент активно изучается несколькими

Таблица 3. Распространение аминогликозидфосфотрансфераз различного типа у штаммов продуцентов аминогликозидных антибиотиков и клинических изолятов.

APH	Название гена	Расположение в геноме	Выявлен у штамма	Субстрат
APH(4)-Ia	<i>aph(4)-Ia, hph</i>	Плазмида	<i>Escherichia coli</i>	Гигромицин
APH(4)-Ib	<i>aph(4)-Ib, hyg</i>	Хромосома	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	
APH(6)-Ia	<i>aph(6)-Ia, aphD, strA</i>	Хромосома	<i>Streptomyces griseus</i>	Стрептомицин
APH(6)-Ib	<i>aph(6)-Ib, sph</i>	Хромосома	<i>Streptomyces griseus</i>	
APH(6)-Ic	<i>aph(6)-Ic, str</i>	Транспозон	<i>Salmonella enterica, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli</i>	
APH(6)-Id	<i>aph(6)-Id, strB, orfI</i>	Плазмида, геномные острова	<i>Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp., Escherichia coli, Shigella flexneri, Providencia alcalifaciens, Pseudomonas spp., Vibrio cholerae, Edwardsiella tarda, Pasteurella multocida, Aeromonas sp.</i>	
APH(9)-Ia	<i>aph(9)-Ia</i>	Хромосома	<i>Legionella pneumophila</i>	Спектиномицин
APH(9)-Ib	<i>aph(9)-Ib, spcN</i>	Хромосома	<i>Streptomyces flavopersicus</i>	
APH(3')-Ia	<i>aph(3')-Ia, aphA-1</i>	Транспозон	<i>Escherichia coli, Salmonella enterica</i>	Канамицин, неомицин, ливидомицин, паромомицин
APH(3')-Ib	<i>aph(3')-Ib, aphA-like</i>	Плазмида	<i>Escherichia coli</i>	
APH(3')-Ic	<i>aph(3')-Ic, apha1-1AB, apha7</i>	Плазмида, транспозон, геномные острова	<i>Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Serratia marcescens, Corynebacterium spp., Photobacterium spp., Citrobacter spp.</i>	
APH(3')-IIa	<i>aph(3')-IIa, aphA-2</i>	Транспозон	<i>Escherichia coli</i>	Канамицин, неомицин, бутирозин, паромомицин
APH(3')-IIb	<i>aph(3')-IIb</i>	Хромосома	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
APH(3')-IIc	<i>aph(3')-IIc</i>	Хромосома	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	

APH(3')-IIIa	<i>aph(3')-IIIa</i>	Плазмида	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	Канамицин, неомицин, ливидомицин, паромомицин, бутирозин, амикацин, изепамицин
APH(3')-IVa	<i>aph(3')-IVa</i> , <i>aphA4</i>	Хромосома	<i>Bacillus circulans</i>	Канамицин, неомицин, бутирозин, паромомицин
APH(3')-Va	<i>aph(3')-Va</i> , <i>aphA-5a</i>	Хромосома	<i>Streptomyces fradiae</i>	Неомицин, паромомицин
APH(3')-Vb	<i>aph(3')-Vb</i> , <i>aphA-5b</i> , <i>rph</i>	Хромосома	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	
APH(3')-Vc	<i>aph(3')-Vc</i> , <i>aphA-5c</i>	Хромосома	<i>Micromonospora chalcea</i>	
APH(3')-VIa	<i>aph(3')-VIa</i> , <i>aphA-6</i>	Плазмида	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Канамицин, неомицин, паромомицин, бутирозин, амикацин, изепамицин
APH(3')-VIb	<i>aph(3')-VIb</i>	Плазмида	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i>	
APH(3')-VIIa	<i>aph(3')-VIIa</i> , <i>aphA-7</i>	Плазмида	<i>Campylobacter jejuni</i>	Канамицин, неомицин
APH(3')-VIII	<i>aphVIII</i>	Хромосома	<i>Streptomyces rimosus</i>	Канамицин
APH(2'')-Ia	<i>aph(2'')-Ia</i>	Плазмида	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Канамицин, гентамицин, тобрамицин, сизомицин
APH(2'')-IIa	<i>aph(2'')-IIa</i> , <i>aph(2'')-Ib</i>	Хромосома	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Escherichia coli</i>	Канамицин, гентамицин, тобрамицин, нетилмицин
APH(2'')-IVa	<i>aph(2'')-IVa</i> , <i>aph(2'')-Id</i>	Хромосома	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	
APH(2'')-Ie	<i>aph(2'')-Ie</i>	Плазмида, транспозон	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i>	Канамицин, гентамицин, тобрамицин
APH(2'')-IIIa	<i>aph(2'')-IIIa</i> , <i>aph(2'')-Ic</i>	Плазмида	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
APH(3'')-Ia	<i>aph(3'')-Ia</i> , <i>aphE</i> , <i>aphD2</i>	Хромосома	<i>Streptomyces griseus</i>	Стрептомицин
APH(3'')-Ib	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>strA</i> , <i>orfH</i>	Плазмида, транспозон, Хромосома	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>	

APH(3'')-Ic	<i>aph(3'')-Ic</i>	Хромосома	<i>Micobacterium fortuitum</i>	Стрептомицин
APH(7'')-Ia	<i>aph(7'')-Ia, aph7''</i>	Хромосома	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Гигромицин

Установлено, что ферменты семейства аминогликозидфосфотрансфераз схожи по структуре и функциям с серин-треониновыми протеинкиназами эукариот и по современной классификации отнесены к киназам, модулирующим устойчивость бактерий к антибиотикам [Kim and Mobashery, 2005; Morar and Wright, 2010].

Подсемейство аминогликозид-(3')-фосфотрансфераз

Подсемейство аминогликозид-3'-фосфотрансфераз является наиболее распространенной и изученной группой фосфотрансфераз. В состав данного подсемейства входят восемь изоферментов, которые будут рассмотрены далее [Сизова и др., 2002; Vakulenko and Mobashery, 2003; Yang and Ye, 2010].

APH(3')-I

У грамотрицательных микроорганизмов наиболее распространенным является фермент Aph(3')-I, обуславливающий резистентность к канамицину, неомицину, ливидомицину и паромомицину. Ген первой изученной Aph(3')-I, *aph(3')-Ia*, был обнаружен в транспозоне Tn903 *E. coli*. Этот фермент обнаружен у следующих грамотрицательных штаммов микроорганизмов: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* и *Pasteurella piscicida*. Недавно ген *aph(3')-I* был обнаружен грамположительного штамма *Corynebacterium striatum* [Tauch et al., 2000; Vakulenko and Mobashery, 2003].

APH(3')-II

В отличие от *aph(3')-I*, *aph(3')-II* редко встречается в клинических изолятах, несмотря на их схожий спектр устойчивости и локализацию в плаزمиде. Фермент модифицирует такие антибиотики, как канамицин, неомицин, паромомицин и бутирозин. Ген *aph(3')-IIa* был впервые обнаружен в транспозоне Tn5 *E. coli*, а ген *aph(3')-IIb* в хромосоме *Pseudomonas aeruginosa* [Zeng, Jin, 2003; Steiniger-White et al., 2004]. Белок Aph(3')-IIb имеет 52%-ную идентичность и 67%-ное сходство по аминокислотной последовательности с Aph(3')-IIa. Недавно был обнаружен еще один изофермент, относящийся к Aph(3')-II в штамме *Pseudomonas aeruginosa* [Riccio et al., 2001; Karaman et al., 2013].

APH(3')-III

Ген *aph(3')-III* был впервые обнаружен в штаммах *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus faecalis*. Позднее ген *aph(3')-III* был идентифицирован в штамме *Campylobacter coli*, что является первым достоверно известным случаем передачи генов устойчивости к антибиотикам

между грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами. Недавно ген *aph(3')-IIIa* обнаружен в штамме *Staphylococcus haemolyticus* [Krzyminska et al., 2015]. *Aph(3')-III* обуславливает устойчивость к канамицину, неомицину, ливидомицину, паромомицину, бутирозину, амикацину и изепамицину [Vakulenko and Mobashery, 2003].

APH(3')-IV-VIII

Гены *aph(3')-IV* и *aph(3')-V* были обнаружены в штаммах микроорганизмов, продуцирующих антибиотики. Фосфотрансфераза *Aph(3')-IV* обнаружена у штамма *Bacillus circulans*; *Aph(3')-V* обнаружены у штаммов *Streptomyces fradiae* (Va), *Streptomyces ribosidificus* (Vb) и *Micromonospora chalybeata* (Vc). Гены двух других ферментов, *Aph(3')-VI* и *Aph(3')-VII*, были клонированы из штаммов *Acinetobacter baumannii* и *Campylobacter jejuni* соответственно. *Aph(3')-VI* модифицирует такие аминогликозидные антибиотики, как амикацин, изепамицин, канамицин, неомицин, паромомицин и бутирозин. *Aph(3')-VII* обуславливает устойчивость канамицину и неомицину, однако распространение гена до конца не изучено [Vakulenko and Mobashery, 2003]. Фосфотрансфераза *Aph(3')-VIII* была обнаружена у штамма *Streptomyces rimosus* (молчащий ген) и фосфорилирует канамицин [Сизова и др., 2002; Елизаров и др., 2005; Беккер и др. 2010; Zhukova et al., 2011; Елизаров и др. 2012].

Структура аминогликозидфосфотрансфераз

Aph состоит из двух структурных доменов: N-концевого и C-концевого, соединенных между собой петлевым доменом. N-концевой домен состоит из 5 антипараллельных β-складчатых слоев. C-концевой домен представляет собой длинную α-спираль и подразделяется на 2 субдомена - коровый и спиралевидный. N-концевой домен и коровый субдомен консервативны у представителей аминогликозидфосфотрансфераз и эукариотических протеинкиназ, они совместно осуществляют связывание нуклеотидного субстрата и катализ. Спиралевидный субдомен более вариабелен, он участвует в специфическом узнавании и связывании молекулы аминогликозидного антибиотика [Badarau et al., 2008; Stogios et al., 2011; Lallemand et al., 2012].

Структурные элементы, участвующие в связывании АТФ и молекулы аминогликозида довольно схожи, несмотря на значительные различия аминокислотных последовательностей. На основании анализа имеющихся кристаллических структур, было определено 4 структурных части каталитического центра фермента (рисунок 5):

- 1) область, ответственная за связывание с аминогликозидным субстратом;
- 2) область, ответственная за каталитический перенос фосфат-иона;
- 3) область, ответственная за связывание с АТФ;
- 4) область, ответственная за гидролиз фосфодиэфирной связи АТФ [Shi et al., 2013].

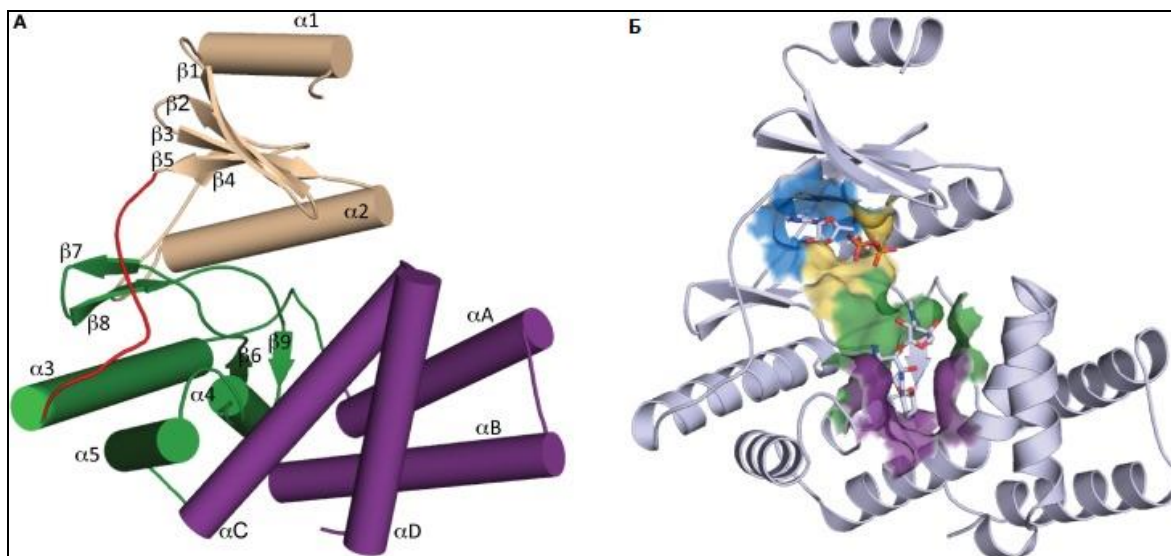


Рисунок 5. Структура аминогликозидфосфотрансфераз [Shi et al., 2013].

А – Вторичная структура фермента Aph. N-концевая область фермента окрашена в коричневый цвет, область каталитического центра и спиральные поддомены С-концевой области окрашены в зеленый и фиолетовый цвета соответственно;

Б – Трехмерная структура Aph(2'')-IIa в комплексе с АДФ и гентамицином. Область, ответственная за связывание с субстратом (гентамицином) окрашена в синий цвет, область связывания с АТФ окрашена в желтый цвет, область, ответственная за гидролиз фосфодиэфирной связи АТФ – зеленым, а область, ответственная за каталитический перенос фосфора – фиолетовым цветом.

1.4.2. Получение и анализ трехмерных структур аминогликозид-3'-фосфотрансфераз

Изучение структуры аминогликозидфосфотрансфераз является важным этапом решения проблемы устойчивости бактерий к аминогликозидным антибиотикам. На данный момент получено более трех десятков кристаллических структур аминогликозидфосфотрансфераз [Zarate et al., 2018]. В данном разделе будут подробно рассмотрены трехмерные структуры ферментов подсемейства Aph(3').

Изучение трехмерных структур Aph(3')-IIa

Кристаллическая структура Aph(3')-IIa в комплексе с канамицином была получена в высоком разрешении (2.1 Å) при помощи метода молекулярного моделирования, на основании уже имеющейся в базе данных структуры Aph(3')-III (R-фактор приняли равным 0,206). Кристаллическая структура Aph(3')-IIa представлена на рисунке 6А. При этом установлено, что

молекула канамицина связывается с ферментом строго специфически в области его С-концевого домена, как показано на рисунке 6Б [Nurizzo et al., 2003].

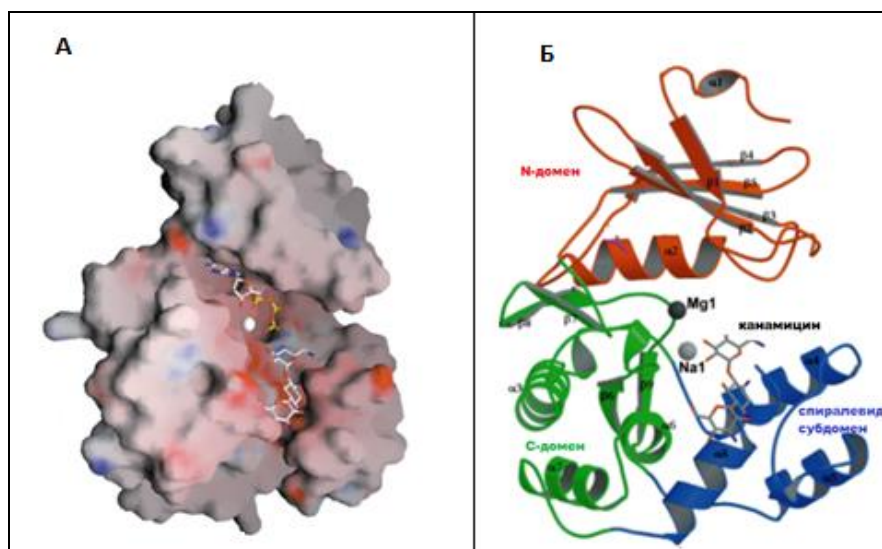


Рисунок 6. Структуры фермента Aph(3')-IIa [Nurizzo et al., 2003].

А – Кристаллическая структура Aph(3')-IIa в комплексе с канамицином;

Б – Трехмерная структура Aph(3')-IIa в комплексе с канамицином. N-концевой домен выделен красным цветом, С-концевой домен – зеленым, спиралевидный субдомен – голубым. Данное изображение получено при помощи программ Molscript и Raster3D.

Предсказана область связывания канамицина аминогликозидфосфотрансферазой Aph(3')-IIa. Молекула канамицина связывается с ферментом в области, которая образуется между спиралью $\alpha 6$ центрального ядра С-концевого домена и спиралевидным субдоменом. Связывание канамицина происходит посредством образования водородных связей с остатками Asp190, Arg211, Asp227, Glu230, Asp159, Glu160, Glu262 и Phe264, как показано на рисунке 7 [Nurizzo et al., 2003].

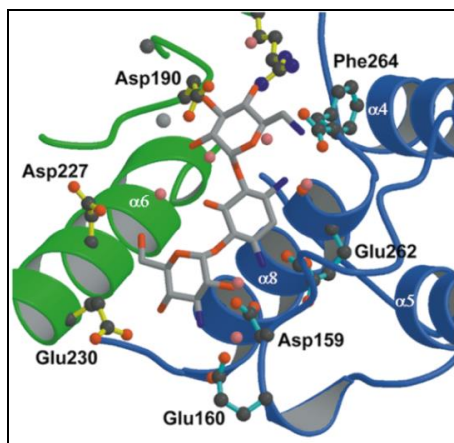


Рисунок 7. Область связывания канамицина аминогликозидфосфотрансферазой Aph(3')-IIa [Nurizzo et al., 2003].

Изучение трехмерных структур Aph(3')-IIb

Фермент Aph(3')-IIb имеет 52%-ную идентичность и 67%-ное сходство по аминокислотной последовательности с Aph(3')-IIa [Vakulenko, Mobashery, 2003]. Ген *aph(3')-IIb* был клонирован в плазмиду pET11d и экспрессирован в *E. coli*. Авторами данной работы была произведена оптимизация процедуры выделения и очистки белка Aph(3')-IIb, а также измерена его ферментативная активность, данные измерений представлены в таблице 4 [Hainrichson et al., 2007].

Таблица 4. Кинетические параметры ферментативной реакции фосфорилирования аминогликозидных антибиотиков аминогликозид-3'-фосфотрансферазой IIb.

Антибиотик	K_m (мМ)	$k_{кат}$ (c^{-1})	$k_{кат}/K_m$ ($M^{-1}c^{-1}$)
Канамицин	3.1 ± 0.4	1.1 ± 0.1	$(3.6 \pm 0.6) \times 10^5$
Неомицин	17.5 ± 0.9	2.1 ± 0.1	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^5$
Рибостамицин	10.0 ± 0.5	1.9 ± 0.1	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^5$
Амикацин	440.0 ± 20.0	1.6 ± 0.1	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^3$

Ген третьего представителя данной группы ферментов, *aph(3')-IIc*, был обнаружен в хромосоме штамма *Stenotrophomonas maltophilia*, выделенного из клинического изолята K279a, однако кристаллическая структура фермента не получена [Okazaki and Avison, 2007].

Изучение трехмерных структур Aph(3')-IIIa

Кристаллическая структура Aph(3')-IIIa в комплексе с АДФ была получена в разрешении 2.2 Å (рисунок 8). Данная трехмерная структура является одной из первых изученных структур аминогликозидфосфотрансфераз. Структура Aph(3')-IIIa близка к таковой у эукариотических протеинкиназ, несмотря на большие различия по нуклеотидным последовательностям у представителей данных групп ферментов. Обнаружены как сходства данных структур в области связывания молекулы АДФ так и существенные различия в расположении и конформации тех аминокислотных остатков, которые предположительно ответственны за специфичность связывания второго субстрата (в случае аминогликозидфосфотрансфераз - антибиотика). Эти результаты показывают, что аминогликозидфосфотрансферазы и протеинкиназы эукариотического типа имеют общего предшественника [Hon et al., 1997]. Данный факт рассмотрен подробнее в разделе 1.4.3 данной работы.

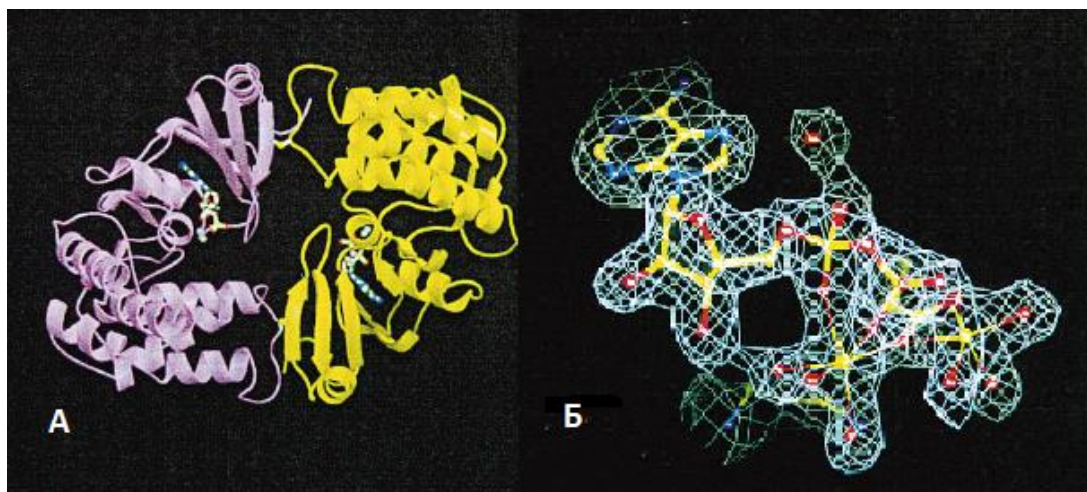


Рисунок 8. Трехмерная (А) и кристаллическая (Б) структуры фермента Aph(3')-Ша [Hon et al., 1997].

А – показано, что фермент состоит из двух субъединиц, соединенных посредством двух цистеиновых мостиков между остатками Cys19 и Cys156;

Б – Aph(3')-Ша в комплексе с молекулой АДФ, связанной с остатками Asn195 и Asp208 фермента, а также с двумя молекулами Mg^{2+} .

Позднее были получены кристаллические структуры Aph(3')-Ша в нативном состоянии и Aph(3')-Ша в комплексе с негидролизуемым аналогом АТФ в разрешении 3.2 Å и 2.4 Å соответственно. Также повторно (с более высоким разрешением) получена кристаллическая структура Aph(3')-Ша в комплексе с молекулой АДФ, описанная ранее. Различия между Aph(3')-Ша в комплексе с АДФ и в комплексе с негидролизуемым аналогом АТФ наблюдались только в области нуклеотид-связывающего кармана. Положение консервативных остатков активного сайта фермента оставалось неизменным, однако имелись различия в координации ионов Mg^{2+} между этими двумя нуклеотидными комплексами [Burk et al., 2001].

Кроме того, была получена молекулярная структура Aph(3')-Ша в комплексе с канамицином, Mg^{2+} и АДФ, а также при помощи метода ЯМР была изучена динамика конформационных изменений данного комплекса [Fong and Berghuis, 2002; Ozen et al., 2008; Wu and Serpersu, 2009; Wieninger et al., 2011].

Недавно была получена кристаллическая структура белка Rv3168 штамма *Micobacterium tuberculosis*, которая оказалась очень близка к кристаллической структуре Aph(3')-Ша, выделенной из *Enterococcus faecalis*. На основании данного сходства сделано предположение, что белок Rv3168 относится к группе аминогликозидфосфотрансфераз [Ahn and Kim, 2013].

Предсказана область связывания канамицина и неомицина аминогликозид-фосфотрансферазой Aph(3')-IIIa. Как продемонстрировано на рисунке 9, во взаимодействии с канамицином участвуют аминокислотные остатки Arg226, Glu160, Glu157, Phe264, Ser27, Gly25, Asp190; во взаимодействии с неомицином участвуют аминокислотные остатки Asp231, Ser99, Asp193, Asp290, Gly25, Ser27, Phe264, Glu157 [Wieninger et al., 2011].

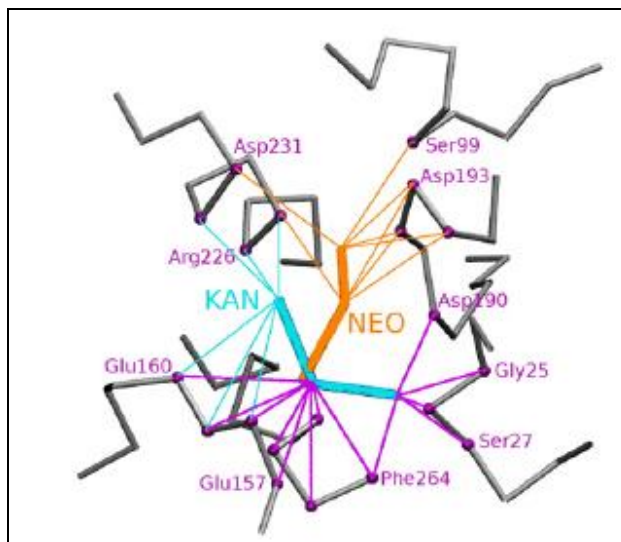


Рисунок 9. Сравнение областей связывания канамицина и неомицина ферментом Aph(3')-IIIa [Wieninger et al., 2011].

Нуклеотид-связывающий карман фермента находится в области, которая образуется между С-концевым и N-концевым доменом. Во взаимодействии с АДФ и двумя ионами Mg^{2+} участвуют аминокислотные остатки Lys44, Glu60, Asp190, Asn195, Asp208, выделенные на рисунке 10 [Hon et al., 1997; Burk et al., 2001].

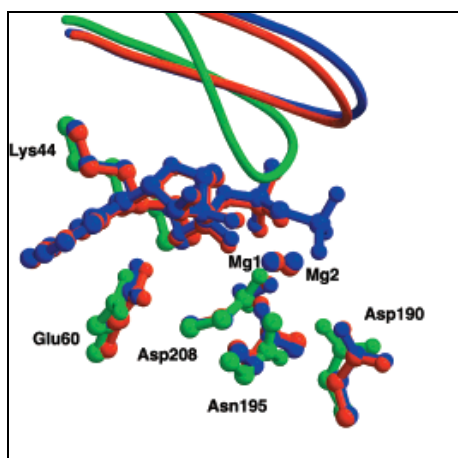


Рисунок 10. Область нуклеотид-связывающего кармана Aph(3')-IIIa [Burk et al., 2001].

1.4.3. Эволюционное и структурное сходство аминогликозидфосфотрансфераз и серин-треониновых протеинкиназ

В трехмерных структурах Aph(3')-IIa, Aph(3')-IIIa и других аминогликозидфосфотрансфераз, полученных методом кристаллографического анализа, было выявлено высокое сходство с некоторыми эукариотическими киназами, даже в том случае, когда их аминокислотные последовательности различались. Максимальное сходство Aph и СТПК наблюдается в зоне АТФ-связывающего кармана, особенно в N-концевой области ферментов, показанной на рисунке 11А-В [Hon et al., 1997; Nurizzo et al., 2003; Fong et al., 2011].

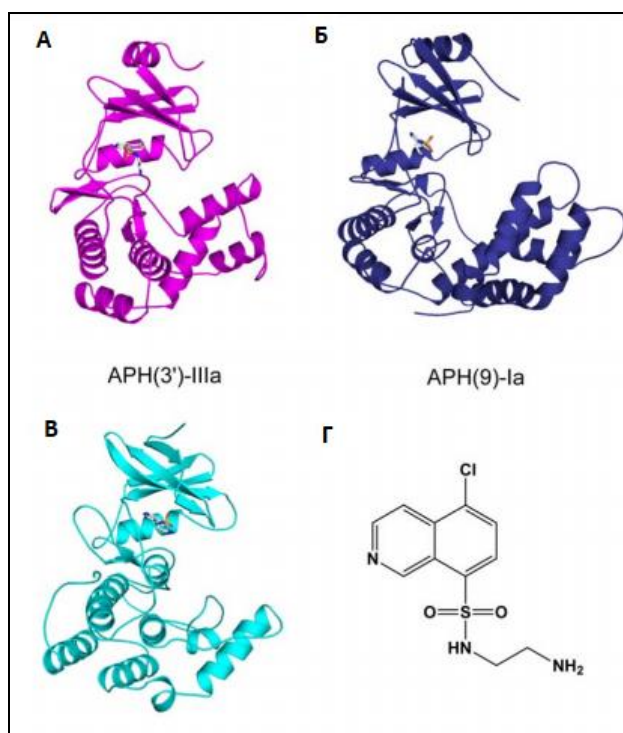


Рисунок 11. Трехмерные структуры SKI-7-связывающих киназ [Fong et al., 2011].

А – Aph(3')-IIIa; Б – Aph(9)-Ia; В – SK1 (casein kinase); Г – химическая структура ингибитора SKI-7.

Кроме наличия структурного сходства было также выявлено, некоторые ингибиторы эукариотических протеинкиназ оказывают ингибирующее воздействие и на аминогликозидфосфотрансферазы, восстанавливая чувствительность к аминогликозидным антибиотикам. Так, например, было показано, что фермент Aph(3')-IIIa ингибируется изохинолинсульфонамидами (ингибиторами СТПК) по механизму конкурентного связывания с АТФ [Diagle et al., 1997]. Например, ингибитор СТПК N-(2-аминоэтил)-5-хлоризохинолин-8-сульфонамид (SKI-7; рисунок 11Г) имеет константу ингибирования 65 мМ для Aph(3')-IIIa, [Fong et al., 2011].

В 2011 году были впервые получены две трехмерные структуры *Aph* в комплексе с ингибитором СТПК, *Aph*(3')-IIIa и *Aph*(9)-Ia с ингибитором СКИ-7. Показано, что ингибитор СКИ-7 взаимодействует с нуклеотид-связывающим карманом ферментов, изменяя конформацию нуклеотид-связывающей петли, сегмента, гомологичного глицин-богатой петле СТПК, что представлено на рисунке 12 [Fong et al., 2011].

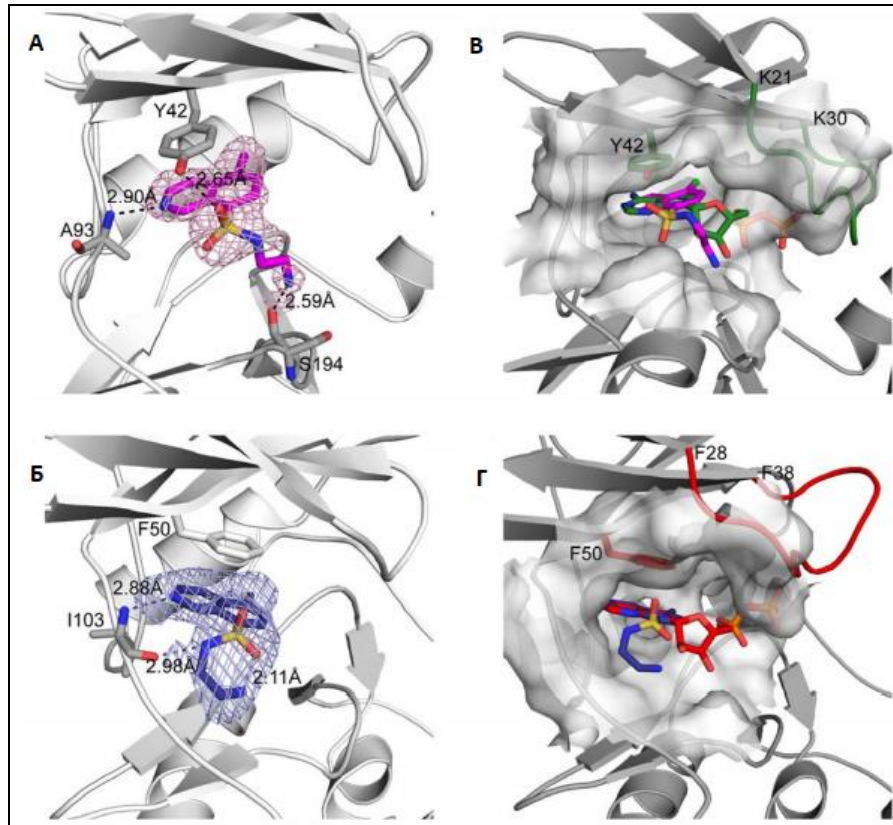


Рисунок 12. Нуклеотид/ингибитор-связывающие области *Aph*(3')-IIIa и *Aph*(9)-Ia [Fong et al., 2011].

А – взаимодействие *APH*(3')-IIIa и ингибитора СТПК СКИ-7;

Б – взаимодействие *APH*(9)-Ia и ингибитора СТПК СКИ-7;

В – сравнение структур в комплексе с ингибитором и при связывании с АТФ аминогликозидфосфотрансферазы *Aph*(3')-IIIa

Г – сравнение структур в комплексе с ингибитором и при связывании с АТФ аминогликозидфосфотрансферазы *Aph*(9)-Ia.

Недавно было экспериментально подтверждено, что сверхэкспрессия каталитической субъединицы эукариотической киназы РКА, которая имеет структурное сходство с *Aph*, повышает устойчивость к некоторым аминогликозидам. Данный факт также служит доказательством структурного и функционального сходства аминогликозидфосфотрансфераз и некоторых СТПК [Sanchez-Carrera et al., 2017].

Основываясь на совокупности данных, полученных методами биоинформатического анализа, изучения трехмерных структур, механизмов действия и ингибирования ферментов, сделано заключение об эволюционном сходстве аминогликозидфосфотрансфераз и эукариотических СТПК, рисунок 13. Данное заключение позволяет предположить о наличии связи между механизмами антибиотикоустойчивости у бактерий и передачей сигналов у эукариот. Вероятно, Aph и СТПК имели общего эволюционного предшественника [Hon et al., 1997; Daigle et al., 1999].

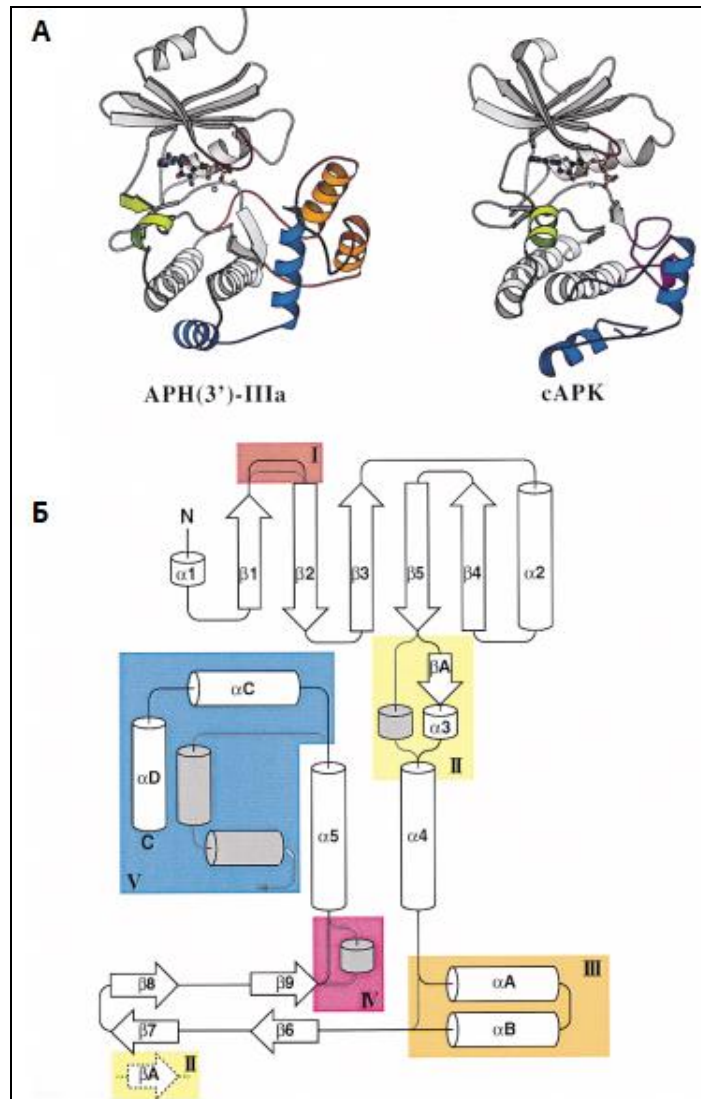


Рисунок 13. Структура Aph(3')-IIIa в сравнении с эукариотическими протеинкиназами [Daigle et al., 1999].

А – сравнение структур Aph(3')-IIIa и сАМР-зависимой протеинкиназы;

Б – двухмерная структура Aph(3')-IIIa, на которой выделены области, отличающиеся от сАМР-зависимой протеинкиназы.

1.4.4. Исследование ингибиторов аминогликозид-3'-фосфотрансфераз

Одним из перспективных подходов, применяемых для преодоления устойчивости к аминогликозидным антибиотикам, является использование ингибиторов аминогликозид-фосфотрансфераз [Azucena and Mobashery, 2001; Burk and Berghuis, 2002; Boehr et al., 2003]. Поскольку число новых аминогликозидных антибиотиков и потенциальных ингибиторов аминогликозидфосфотрансфераз постоянно растет, то становится важно разрабатывать новые эффективные методы скрининга данных соединений. Ингибиторы ферментов, модифицирующих аминогликозидные антибиотики, должны ингибировать один или, в идеале, несколько ферментов, не нарушая при этом связывание молекул аминогликозидов с рибосомами [Labby and Garneau-Tsodikova, 2013].

Одним из подходов к решению проблемы устойчивости бактерий к антибиотикам является разработка адьювантов [Pascale and Wright, 2010]. Такая стратегия была успешно использована для предотвращения устойчивости к β -лактамным антибиотикам за счет снижения активности β -лактамаз [Therrien and Levesque, 2000]. Поскольку для аминогликозидных антибиотиков, используемых для лечения тяжелых нозокомиальных инфекций, основной механизм резистентности это ферментативная инактивация препарата ацетилтрансферазами, нуклеотидилтрансферазами или фосфотрансферазами, то ингибиторы этих ферментов могут быть использованы для разработки медикаментозно-адьювантной терапии [Shaw et al., 1993; Burk and Berghuis, 2002; Gao et al., 2006]. Среди трех групп аминогликозид-модифицирующих ферментов, аминогликозидфосфотрансферазы обеспечивают самые высокие уровни устойчивости, что делает рациональным поиск ингибиторов в первую очередь именно для этой группы ферментов [Vakulenko and Mobashery, 2003].

Изучение ингибиторов аминогликозидфосфотрансферазы Aph(3')-IIa

Проведен скрининг более 80 соединений, потенциально обладающих ингибирующим действием в отношении двенадцати представителей группы аминогликозидфосфотрансфераз (рисунок 14). Установлено, что пиридопиримидины селективно ингибируют только аминогликозид-3'-фосфотрансферазы, а флавоноиды оказывают ингибирующее воздействие на все исследованные ферменты. Так, флавоноид кверцетин ингибирует все изучаемые в данном исследовании Aph. Ингибиторами фермента Aph(3')-IIa являются кверцетин, тирфостин-25, 5-йодотубрицидин и изохинолин-сульфонамид KN93. Несмотря на то, что некоторые из исследуемых соединений значительно снижали уровень активности Aph, ни один из ингибиторов не блокировал действие ферментов полностью [Shakya et al., 2011].

Изучение ингибиторов аминокликозидфосфотрансферазы Aph(3')-IIIa

Как описывалось ранее, аминокликозид-3'-фосфотрансферазы структурно гомологичны эукариотическим протеинкиназам, и было показано, что на активность некоторых из них могут влиять ингибиторы протеинкиназ. Установлено, что химические соединения, относящиеся к группе изоквинолинсульфонамидов, наиболее эффективно ингибируют Aph(3')-IIIa. Важно отметить, что их взаимодействие происходит по механизму конкурентного ингибирования в отношении АТФ и неконкурентного – в отношении аминокликозидного субстрата. Так, изоквинолинсульфонамиды Н-7, Н-9, НА-1004, СКI-7, и СКI-8 являются конкурентными ингибиторами АТФ за связывание в области активного центра фермента Aph(3')-IIIa, а Н-9 является неконкурентным ингибитором в области связывания с канамицином (таблица 5). Алкалоид стауроспорин, ингибирующий протеинкиназу С и некоторые другие эукариотические протеинкиназы с $K_i \leq 10$ мМ, не оказывает ингибирующего действия на Aph(3')-IIIa в концентрации 0.7 – 0.1 мМ. Авторы данной работы установили, что флавоноиды генистеин и кверцетин являются ингибиторами (конкурирующими с АТФ за связывание в активном центре фермента) киназы рецептора эпидермального фактора роста и других тирозинкиназ. В частности, генистеин не ингибирует Aph(3')-IIIa, а близкое к нему по химической структуре соединение кверцетин оказывает ингибирующее действие на фермент [Daigle et al., 1997].

Таблица 5. Ингибирование аминокликозидфосфотрансферазы Aph(3')-IIIa.

Ингибитор	Субстрат	Механизм ингибирования	K_{is}	K_{ii}
СКI-7	АТФ	конкурентное	66.1±7.5	260.0±19.0
СКI-8	АТФ	конкурентное	290.0±89.0	
Н-7	АТФ	конкурентное	730.0±130.0	
Н-9	АТФ	конкурентное	138.0±40.0	
Н-9	канамицин А	неконкурентное	155.0±26.0	
НА-1004	АТФ	конкурентное	48.9±12.3	
Генистеин	АТФ	конкурентное	-	
Кверцетин	АТФ	конкурентное	126.0±22.0	
Стауроспорин	АТФ	конкурентное	-	

При помощи метода кристаллизации получен комплекс Aph(3')-IIIa с ингибитором СКI-7 (который также является ингибитором ряда эукариотических протеинкиназ, в частности казеинкиназы-1). Данные кристаллы выращивались с использованием ПЭГ-3000 (был использован для осаждения белков). В результате была получена структура в разрешении 2.5 Å,

изображенная на рисунке 15А [Fong and Berghuis, 2004]. Впоследствии была получена трехмерная структура данного комплекса. Показано, что ингибитор СКИ-7 связывается с ферментом в области нуклеотид-связывающего кармана, изменяя при этом конформацию нуклеотид-связывающей петли, рисунок 15Б [Fong et al., 2011].

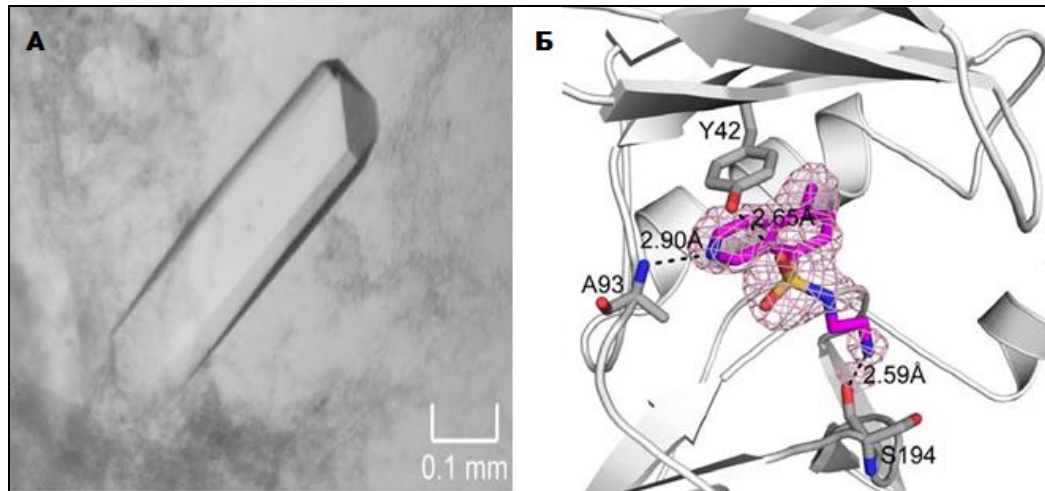


Рисунок 15. Aph(3')-IIIa в комплексе с ингибитором СКИ-7 [Fong et al., 2011].

А – промежуточный этап получения кристаллической структуры комплекса;

Б – трехмерная структура комплекса.

К ингибиторам аминокликозид-3'-фосфотрансфераз также относятся анкирин-подобные белки. Они являются специфическими внутриклеточными ингибиторами. Авторами данного исследования был проведен скрининг ингибиторов Aph(3')-IIIa на основании имеющихся в нескольких биоинформатических базах данных анкирин-подобных белков, в результате которого было выявлено 198 потенциальных ингибитора. Анализ нескольких из этих ингибиторов показал, что они связывают Aph(3')-IIIa с высокой специфичностью и эффективностью [Amstutz et al., 2005]. Чуть позже была получена структура Aph(3')-IIIa в комплексе с анкирин-подобным белком AR-3a в разрешении 2.15 Å, рисунок 16. При этом было установлено, что AR-3a связывается с С-концевой областью Aph(3')-IIIa, стабилизируя при этом три α-спирали, участвующие во взаимодействии с аминокликозидным субстратом. Именно по такому механизму происходит аллостерическое ингибирование фермента. Важно отметить, что в отличие от большинства низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ, анкирин-подобные белки не взаимодействуют непосредственно с активным центром белка, тем самым обладая большей специфичностью к ферменту по сравнению с другими ингибиторами [Kohl et al., 2005].

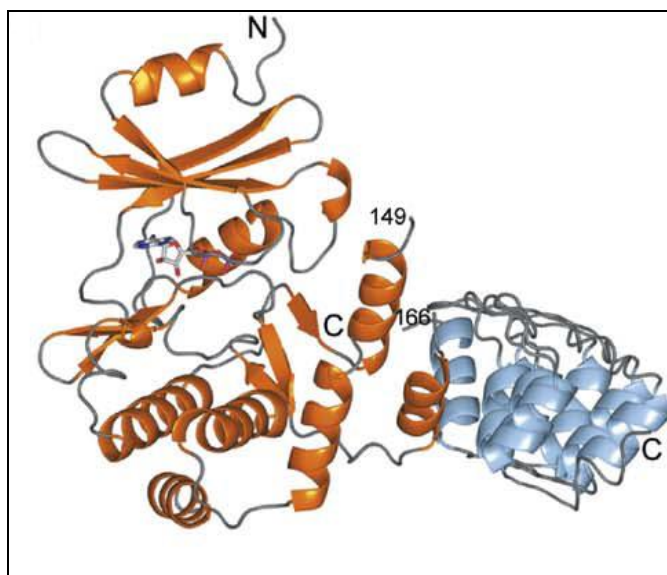


Рисунок 16. Трехмерная структура комплекса Aph(3')-IIIa с ингибитором AR-3a, фермент Aph(3')-IIIa выделен оранжевым цветом, ингибитор - голубым [Kohl et al., 2005].

Бутирозин – уникальный природный аминогликозидный антибиотик, имеющий замену аминогруппы в первом положении (N1) 2-деоксистриптаминового кольца на (S)-4-амино-2-гидроксипропановую (АНВ) группу. АНВ группа защищает аминогликозидные антибиотики от модификации многими ферментами. В настоящее время разработано несколько полусинтетических N1-замещенных аминогликозидов, таких как амикацин, исепамицин и нетилмицин. Однако антибиотики бутирозин, амикацин, и исепамицин инактивируются аминогликозидфосфотрансферазой Aph(3')-IIIa. Кристаллическая структура Aph(3')-IIIa в комплексе с бутирозином получена в разрешении 2,4 Å. Показано, что бутирозин связывается с ферментом аналогично другим 4,5-дизамещенным аминогликозидам [Fong and Berghuis, 2009].

Глава 1.5. Аминогликозидфосфотрансфераза Aph(3')-VIII

Фермент AphVIII выделен из штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. При изучении спектра устойчивости к антибиотикам у 110 штаммов рода *Streptomyces* обнаружено, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970, единственный среди изученных обладает устойчивостью к большинству аминогликозидных антибиотиков в концентрации до 20 мкг/мл [Даниленко и др., 1977]. Данный штамм продуцирует окситетрациклин, но при этом не синтезирует какой-либо аминогликозидный антибиотик.

1.5.1. Амплификация и генетическая нестабильность гена *aph(3')-VIII*

При многоступенчатой селекции клеток *S. rimosus* ATCC 10970, устойчивых к возрастающим дозам канамицина (от 10 до 4×10^4 мкг/мл), удалось получить штамм, обладающий активностью аминогликозид-3'-фосфотрансферазы и содержащий перестройки в хромосомной ДНК. Был обнаружен детерминант антибиотикоустойчивости штамма *S. rimosus* ATCC 10970, обозначенный как Km^r , амплифицирующийся в составе фрагмента ДНК размером $10,3 \times 10^6$ п.н. и характеризующийся генетической нестабильностью, частота перехода $Km^r \leftrightarrow Km^s$ составляет 1×10^{-3} . Этот тип нестабильности широко распространен среди актиномицетов и характерен для большинства признаков, не связанных с первичным метаболизмом [Потехин и Даниленко, 1985].

1.5.2. Клонирование и экспрессия гена *aph(3')-VIII* в *Streptomyces lividans*, *Escherichia coli*, *Chlamydomonas reinhardtii*

Детерминант Km^r был клонирован в штамм *Streptomyces lividans* 66 в составе векторной плазмиды SLP1.2, подробно изучалось явление амплификации данного детерминанта в составе сконструированных гибридных плазмид pSU1-pSU13. Было показано, что субклонирование данного фрагмента хромосомной ДНК в составе описанных плазмид обеспечивает устойчивость клеток *Streptomyces lividans* к канамицину, неомицину и паромомицину. Грубые бесклеточные экстракты таких трансформантов имеют активность аминогликозид-фосфотрансферазы, субстратная специфичность которой соответствует спектру антибиотикоустойчивости. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащая детерминанту Km^r , определена, найдена открытая рамка считывания для гена аминогликозид-3'-фосфотрансферазы. На основании нуклеотидной последовательности и субстратной специфичности кодируемого фермента, ген *aph* из *S. rimosus* ATCC 10970 отнесен к новому классу генов и обозначен как *aph(3')-VIII*, а его продукт обозначен как Aph(3')-VIII [Потехин и Даниленко, 1985; Стародубцева, 1985; Даниленко В.Н. и др., 1997].

В ходе дальнейших исследований, ген *aph(3')-VIII* был клонирован в одноклеточную зеленую водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* в составе плазмидного вектора pSU973. Было продемонстрировано, что ядерные трансформанты этой водоросли, несущие вектор pSU973:*aph(3')-VIII* обладают высокой устойчивостью к паромомицину (300-500 мкг/мл). Анализ суммарных белков трансформантов с использованием ПААГ-электрофореза в неденатурирующих условиях показал, что аминогликозидфосфотрансферазную активность проявляет белок с молекулярной массой около 30 кДа [Sizova et al., 1996; Sizova et al., 2001].

Нуклеотидная последовательность гена *aph(3')-VIII* была уточнена и задепонирована в GenBank под номером AAG11411. Данная последовательность имеет длину 804 п.н. и кодирует белок APHVIII протяженностью 267 аминокислот, с молекулярной массой 29,1 кДа и изоэлектрической точкой 4.59. Сравнение аминокислотных последовательностей Aph(3')-VIII и аминогликозидфосфотрансфераз из штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков позволило выявить значительные отличия и отнести данный фермент в отдельную группу [Сизова и др., 2002].

Для выяснения роли гена *aph(3')-VIII* штамма *S. rimosus* ATCC 10970, было также проведено его клонирование в *E. coli* BL21(DE3) в составе плазмидного вектора pSI10. Ранее у *S. lividans* были обнаружены хромосомные мутации, влияющие на уровень устойчивости клеток каминогликозидам, возможно, локализованные в гене, кодирующем активатор белка Aph(3')-VIII [Потехин и Даниленко, 1985]. При этом роль активаторов белковой активности у *Streptomyces* могут играть серин-треониновые протиеинкиназы эукариотического типа. Для проверки гипотезы, что APHVIII активируется путем фосфорилирования протеинкиназами, изучали гетерологичную экспрессию гена *aph(3')-VIII* в трансформированных прокариотических клетках, не содержащих протеинкиназы эукариотического типа (*E. coli*) и эукариотических клетках (*Chlamydomonas reinhardtii*). При этом было продемонстрировано, что трансформанты *Chlamydomonas* обладают более высоким уровнем устойчивости к паромомицину при более низком содержании белка Aph(3')-VIII. Данное явление может быть связано с активацией белка посредством его фосфорилирования серин-треониновыми протеинкиназами. Сравнение аминокислотных остатков Aph(3')-VIII и серин-треониновых протеинкиназ актиномицетов выявило локальное подобие протяженностью 38 аминокислот в консервативной области, участвующей в связывании АТФ. При биоинформатическом поиске потенциальных областей фосфорилирования было выявлено 4 области для серин-треониновых протеинкиназ, в том числе, Ca²⁺-зависимых [Сизова и др., 2002].

1.5.3. Исследование фосфотрансферазной активности Aph(3')-VIII *in vivo*

Аминогликозидфосфотрансферазную активность определяли радиохимическим методом в грубом бесклеточном экстракте штамма *S. lividans* ТК64, содержащем плазмиду pSU951:*aph(3')-VIII*. В качестве отрицательного контроля использовали бесплазмидный штамм *S. lividans* ТК64, а в качестве положительного – экстракт клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pSV2нео и продуцирующих стрептомицинтрансферазу. После инкубирования аминогликозидных антибиотиков с ³²P-γАТФ с бесклеточным экстрактом радиомеченные фосфорилированные антибиотики выделяли методом тонкослойной хроматографии с

полиэтиленмин-целлюлозой и измеряли уровень радиоактивности полученных образцов. Было показано, что фермент Aph(3')-VIII обладает фосфотрансферазной активностью в отношении аминогликозидных антибиотиков канамицина, неомицина и паромомицина [Даниленко и др., 1997]. Также изучали аминогликозидфосфотрансферазную активность Aph(3')-VIII в грубых клеточных экстрактах *C. reinhardtii* методом автордиографии, в результате чего была выявлена активность фермента в отношении паромомицина и неомицина [Sizova et al., 1996].

1.5.4. Выделение Aph(3')-VIII и определение субстратной специфичности

Определение субстратной специфичности Aph(3')-VIII проводили, выделяя водорастворимую фракцию белков *E. coli*, трансформированных вектором pET16b:*aph(3')-VIII*. Посредством метода гель электрофореза в денатурирующих условиях выявили фракцию белка с молекулярной массой около 30 кДа. Трансформанты были устойчивы к паромомицину в концентрации до 60 мкг/мл [Сизова, 2002].

В дальнейших работах выделение и очистку Aph(3')-VIII, содержащую His10, из экстрактов *E. coli* проводили с использованием колонок с Ni-NTA-агарозой в нативных условиях, после чего проводили SDS-PAGE. Очистку фракций, содержащих 31.5 кДа белок, проводили хроматографически [Елизаров и др., 2005]. Анализ канамицинкиназной активности фермента проводили в реакционной смеси, содержащей 0.3 мкг Aph(3')-VIII, 1.2 мг/мл канамицина, 7.5 мМ [γ -³²P]АТФ, 4 мМ NaHCO₃, 20 мМ Трис-НСl pH 7.8, 10 мМ MgCl₂, 60 мМ KCl и 3мМ ДТТ. При этом с использованием метода автордиографии была продемонстрирована высокая активность фермента в отношении аминогликозидного антибиотика канамицина [Елизаров и др., 2012].

1.5.5. Способность Aph(3')-VIII фосфорилироваться протеинкиназами, выявление сайтов фосфорилирования

Актиномицеты представляют собой перспективную модель для изучения взаимодействия между протеинкиназами эукариотического типа и аминогликозидфосфотрансферазами в регуляции клеточных процессов и лекарственной устойчивости. При помощи методов иммунопреципитации с антителами к Aph(3')-VIII и мечения *in vitro* было выявлено, что эндогенные протеинкиназы в экстрактах *S. rimosus* активно фосфорилируют Aph(3')-VIII по двум остаткам серина. При этом количество фосфата, включенного в Aph(3')-VIII в 1.84 раза выше в присутствии Ca²⁺. Дальнейший анализ показал, что фосфорилирование Aph(3')-VIII происходит СТПК с молекулярной массой 55 и 74 кДа соответственно, причем активность 55 кДа-киназы зависит от кальция и кальмодулина. Установлено, что канамицин-фосфотрансферазная активность фосфорилированного белка

Aph(3')-VIII в 3.72 раза выше, по сравнению с немодифицированным ферментом. Исследуемые протеинкиназы участвуют в регуляции устойчивости к канамицину в клетках *S. rimosus*, которая может модулироваться через изменение активности специфических лиганд-зависимых СТПК [Елизаров и др., 2005].

Методами биоинформатического анализа и молекулярного моделирования было выявлено 4 потенциальных сайта фосфорилирования Aph(3')-VIII: S95, S146, S160, S215. Для дальнейшей идентификации сайтов фосфорилирования получали мутантные варианты гена *aph(3')-VIII* методом точковых мутаций, при этом заменяли в выявленных позициях Ser→Ala. Сравнительный анализ канамицинкиназной активности нефосфорилированной и фосфорилированной форм исходного и мутантного вариантов Aph(3')-VIII белка показал, что Ca²⁺-зависимое фосфорилирование Ser146 в Aph(3')-VIII приводит к 6-7 кратному увеличению канамицинкиназной активности Aph(3')-VIII. Таким образом, Ser146, расположенный в активационной петле фермента, критичен для его активности. Также показано, что Aph(3')-VIII является ферментом, активируемым протеинкиназами [Елизаров и др., 2012].

1.5.6. Трехмерная структура Aph(3')-VIII

Полноатомная модель структуры Aph(3')-VIII была создана с использованием сервера для моделирования Swiss-Model на основе доступных в базе PDB структур ферментов Aph(3')-II (идентификатор 1ND4) и Aph(3')-III (идентификатор 1L8T). Молекулярное моделирование позволило выявить сайт фосфорилирования Ser146 в активационной петле фермента, что отображено на рисунке 17 [Елизаров и др., 2012].

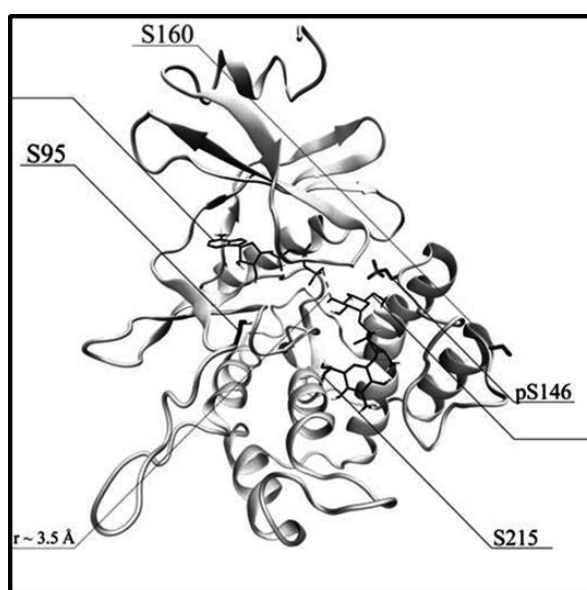


Рисунок 17. Модель третичной структуры Aph(3')-VIII. Положения S95, S146, S160, S215 – вероятные сайты фосфорилирования Aph(3')-VIII [Елизаров и др., 2012].

Анализ молекулярной динамики комплекса нефосфорилированного AphVIII с канамицином, АТФ и двумя ионами Mg^{2+} выявил изменения структуры фермента за счет ослабления контакта между С- и N-концевыми доменами. Подвижность доменов обуславливает высвобождение АТФ от субстрата, связанного с С-концевой долей, и взаимодействие фосфата с N-концевой долей, что приводит к каталитически неактивной форме Aph(3')-VIII [Елизаров и др., 2012].

Методом рентгеноструктурного анализа получена трехмерная структура Aph(3')-VIII с разрешением 2.15 Å, идентификационный номер в PDB – 4H05, рисунок 18 [Boyko et al., 2016].

В результате анализа полученной структуры и сравнения с уже имеющимися структурами аминогликозид-3'-фосфотрансфераз, была выявлена область Ser146 в активационной петле фермента. Показано изменение конформации в данной области, происходящее при взаимодействии с субстратом [Boyko et al., 2016].

1.5.7. Создание тест-систем для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ

Модуляция активности Aph(3')-VIII серин-треониновыми протеинкиназами используется на практике с целью создания высокоэффективных тест-систем для отбора ингибиторов СТПК с использованием конструктора Aph(3')-VIII белка и целевых СТПК человека и бактерий. Принцип работы тест-систем подобного типа построен на том, что фосфорилирование протеинкиназами фермента Aph(3')-VIII, инактивирующего аминогликозидные антибиотики, увеличивает устойчивость бактериальных клеток к канамицину. Ингибиторы протеинкиназ, напротив, делают клетки бактерий чувствительнее к канамицину. Эти свойства тест-системы позволяют проводить подбор биомишеней – ингибиторов протеинкиназ как потенциальных лекарственных средств нового поколения. Первой тест-системой подобного типа является система, разработанная на основе штамма *Streptomyces lividans* TK24 (66) Aph+ [Danilenko et al., 2008]. Еще одним примером такой системы является тест-система *E. coli/aphVIII/pk25*, используемая для идентификации ингибиторов Pk25 штамма *Streptomyces lividans*, а также ее структурных гомологов. В частности, данная тест-система применяется для подбора ингибиторов СТПК ряда патогенных микроорганизмов, таких как PknA и PknJ штаммов *M. tuberculosis*, StkP *S. pneumonia*, и некоторых СТПК человека, в том числе PKA, CaMKI, Pac2 [Беккер и др., 2010].

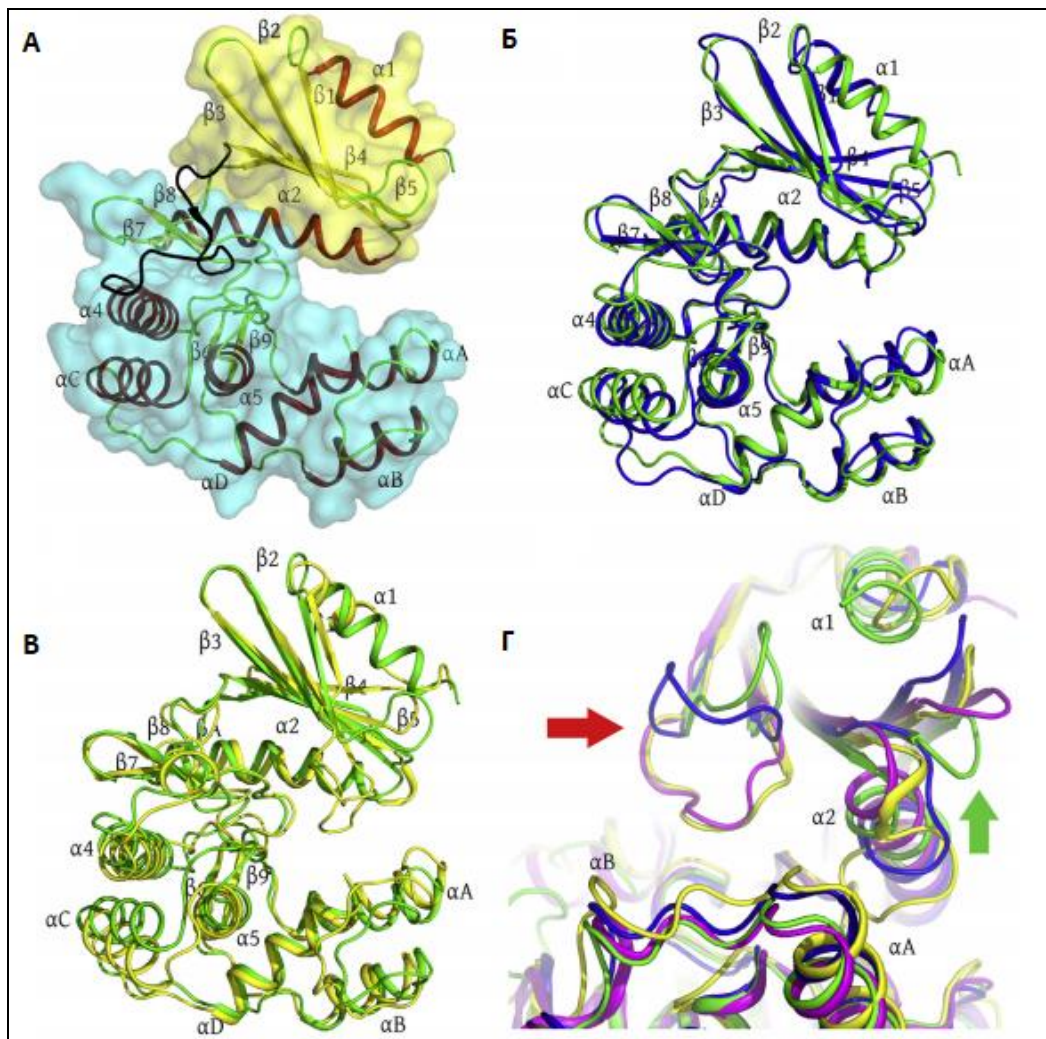


Рисунок 18. Трехмерная структура Aph(3')-VIII и ее сравнение структурами других аминогликозид-(3')-фосфотрансфераз [Boyko et al., 2016].

А – мономер AphVIII. Цветом выделены следующие элементы вторичной структуры: α -спирали – красным, β -слои – желтым, а области петель – зеленым. Домены показаны в виде прозрачных поверхностей: N-терминальный домен выделен желтым цветом, С-терминальный домен – синим;

Б – сравнение AphVIII (показан зеленым цветом) и Aph-II в комплексе с канамицином А (ID PDB – 1ND4, выделен синим цветом);

В – сравнение AphVIII (показан зеленым цветом) и Aph-III в комплексе с ADP и канамицином А (ID PDB – 1L8T, выделен желтым цветом);

Г – увеличенный вид области связывания с субстратом, регион гибкой петли NPL в области 21-27 аминокислотных остатков (нумерация по AphVIII) обозначен красной стрелкой, а петля между $\beta 4$ и $\beta 5$ -складчатыми слоями обозначена зеленой стрелкой. Aph-I в комплексе с ADP (ID PDB – 4EJ7) отображен фиолетовым цветом.

Другой тест-системой подобного типа является система *E. coli/aphVIII/pim-1*. Принцип и особенности работы данной системы представлены на рисунке 19. Сайт-направленный мутагенез в области Ser146 позволил оптимизировать этот сайт для наиболее эффективного фосфорилирования протеинкиназой Pim-1. STPK семейства Pim положительно регулируют клеточный цикл и играют важную роль в патогенезе опухолей системы крови, поддерживая пролиферацию клеток. Ингибиторы STPK семейства Pim являются потенциальными лекарственными препаратами для терапии лейкозов и лимфом [Zhukova et al., 2011].

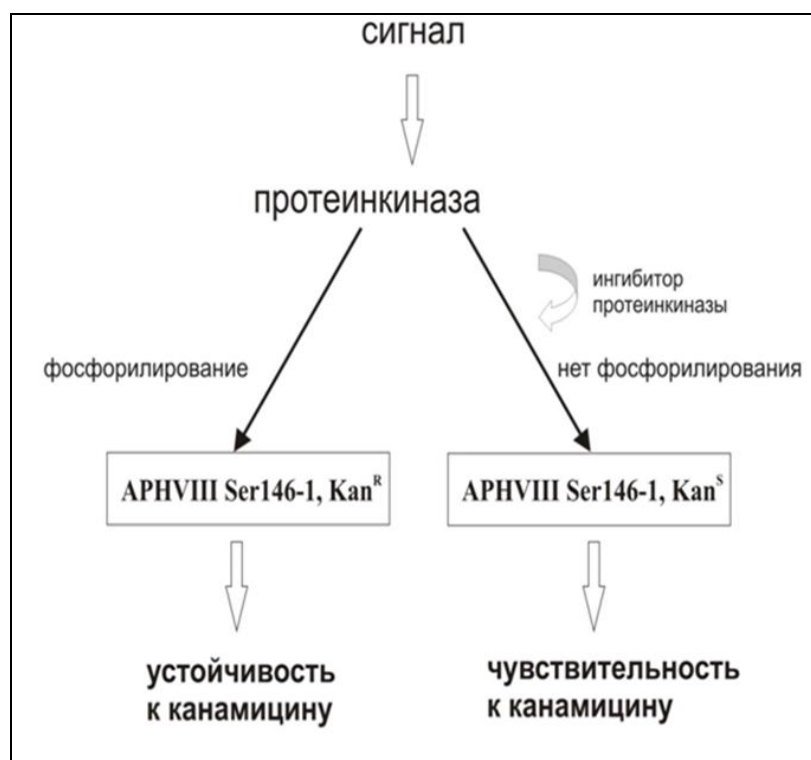


Рисунок 19. Принцип работы тест-системы: фосфорилирование Aph(3')-VIII по Ser146 посредством STPK повышает устойчивость *E. coli* к канамицину; добавление ингибитора препятствует фосфорилированию AphVIII, снижает устойчивость к канамицину [Zhukova et al., 2011].

Еще одной системой подобного типа является недавно разработанная тест-система *E. coli/aphVIII/gsk3β*. Данная система включает в себя ген каталитического домена протеинкиназы GSK3β и ген Aph(3')-VIII, субстрата для фосфорилирования. Для оптимизации работы тест системы получены две модификации Aph(3')-VIII в области сайта фосфорилирования Ser146. Целенаправленный отбор ингибиторов протеинкиназы GSK3β является перспективным направлением в лекарственной терапии диабета II типа, болезни Альцгеймера и хронических воспалительных заболеваний [Алексеева и др., 2018].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Штаммы бактерий

При выполнении работы использовали экспрессионные штаммы *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* NiCo21(DE3), *E. coli* B834(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pLysS, *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus, штамм для молекулярного клонирования *E. coli* DH5 α , а также *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 и *S. lividans* 66. Далее приведены генотипы использованных в работе штаммов.

E. coli DH5 α : F⁻, Φ 80 Δ lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169 [Promega, США; Inoue et al., 1990]

E. coli BL21(DE3): F⁻, *ompT*, *hsdS*(r_B⁻m_B⁻), *gal* λ (DE3), *dcm* [Novagen, Германия; Mierendorf et al., 1994]

E. coli B834(DE3): F⁻, *ompT*, *hsdS*(r_B⁻m_B⁻), *gal*, *met*(DE3), *dcm* [Novagen, Германия; Wood, 1966]

E. coli NiCo21(DE3): *can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int:: i21 Δ nin5 [New England Biolabs, США; Bolanos-Garcia and Davies, 2006]*

E. coli BL21(DE3) pLysS: F⁻, *ompT*, *hsdSB* (r_B⁻, m_B⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), *pLysS*, *Cm*^r [Stratagene, США; Davanloo, 1984]

E. coli BL21(DE3) CodonPlus: *argU*, *ileY*, *leuW* [Stratagene, США; Wang et al., 2007]

Escherichia coli DH5 α является одним из штаммов, наиболее часто используемых для молекулярного клонирования. Штамм *Escherichia coli* DH5 α применяется для повышения эффективности трансформации, молекулярного клонирования, а также выделения плазмид [Woodcock et al., 1989].

Штаммы *Escherichia coli* В в течение многих лет являются объектом молекулярно-генетических экспериментов. Работа со штаммами *Escherichia coli* В имела огромное значение для развития представлений в области биохимии, молекулярной генетики, биотехнологии и системной биологии, а также развития методологии в данных областях науки [Jeong et al., 2009; Robichon et al., 2011].

Подробная информация о штамме *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (<https://www.lgcstandards-atcc.org/>) приведена в разделе 1.1.3. Также в исследованиях использовали штамм *S. lividans* 66, поскольку он хорошо изучен и является модельным объектом. Данный штамм получен из коллекции ВКПМ (<https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov>).

2.2. Состав питательных сред

Для выращивания клеток *E. coli* использовали питательные среды LB с глюкозой, LA и SOB, а для *S. rimosus* – YEME. Полный состав сред приведен в таблице 6.

Таблица 6. Питательные среды, использованные для выращивания штаммов *E. coli* и *S. rimosus*

Название	Состав (на 1 литр)
LB с глюкозой	10 г бакто-триптон, 10 г NaCl, 5 г дрожжевой экстракт, 1 г глюкоза, доводили объем до 1 л дистиллированной H ₂ O pH 7.2-7.4 доводили NaOH
LA	25 г сухой среды LB растворяли в 1 л дистиллированной H ₂ O pH 7.2-7.4 доводили NaOH Добавляли агар 20 г на 1 литр среды
SOB	20 г бакто-триптон, 5.5 г дрожжевой экстракт, 10 г KCl, 2 г NaCl, доводили объем до 1 л дистиллированной H ₂ O (pH 7.2-7.4 доводили KOH); после автоклавирования добавляли стерильно к 1л среды 10 мл 1М MgSO ₄
YEME	бакто-пептон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 3 г/л, мальт-экстракт – 3 г/л, глюкоза – 10 г/л, сахароза – 250 г/л; после автоклавирования к 50 мл среды добавляли стерильно 0,1 мл 2.5М раствора MgCl ₂

Среды стерилизовали в автоклаве при избыточном давлении 0.8 ати (118⁰С) в течение 40 минут.

2.3. Условия культивирования

Штаммы *E. coli* выращивали на жидких и плотных питательных средах.

Для обеспечения селективного роста плазмидсодержащих клеток добавляли ампициллин до конечной концентрации 150 мкг/мл. При выращивании на жидких средах (LB, SOB) инкубировали культуру в термостатируемом шейкере при 37⁰С и 250 об/мин в течение 18 часов. При выращивании на плотных средах (LA) инкубировали культуру в термостате при температуре 37⁰С в течение 18 часов, при этом получали отдельные колонии на чашках Петри. Для проверки устойчивости к аминогликозидным антибиотикам добавляли ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактозид) в концентрации 10 мкг/мл.

С целью наработки биомассы исследуемых штаммом *E. coli* Aph белков проводили выращивание с использованием жидкой питательной среды LB с добавлением ампициллина (150 мкг/мл) в аэрируемых условиях при 250 об/мин и температуре 37⁰С до оптической плотности 0.6 при OD₆₀₀ (~2 часа). Затем индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ до финальной концентрации 1.0–1.4 мМ. Далее проводили культивирование при 26 - 28⁰С в течение 16 часов, после чего биомассу осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин и замораживали при -20⁰С. Штамм *S. rimosus* ATCC 10970 выращивали в термостатируемом шейкере при 28⁰С и 250 об/мин в течение 20 часов.

2.4. Техника посева при помощи штампа-репликатора

Репликатор состоит из двух частей – основания (содержит лунки) и крышки (имеет штыри, соответствующие лункам). Перед использованием штамп-репликатор стерилизовали в сухожаровом шкафу при температуре 180⁰С в течение 2 часов. Для посева заранее заливали чашки с агаризованной средой LA, содержащей ампициллин (150 мкг/мл), индуктор ИПТГ (10 мкг/мл) и аминогликозидные антибиотики в концентрациях 10-500 мкг/мл.

Все процедуры, описанные ниже, производили в стерильных условиях. Во все лунки основания штампа-репликатора вносили по 50 мкл стерильной дистиллированной воды. Посевной материал вносили в лунки в шахматном порядке по рядам, чтобы отдельные колонии не влияли на рост друг друга. Каждый отдельный ряд в данном эксперименте инокулировали одним и тем же штаммом бактерий. Всего в репликатор таким образом возможно внести одиннадцать разных штаммов. Делали отпечатки (реплики) на поверхности плотной среды на чашках Петри при помощи крышки штампа-репликатора. На отпечатках вырастали однородные по величине и форме отдельные колонии [Lederberg, 1952].

2.5. Определение устойчивости к антибиотикам методом стандартных дисков

Методика тестирования заключается в определении величины зоны подавления роста штамма, засеянного газоном на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих исследуемый антибиотик.

Бактерии, выращенные на агаризованной среде, переносили в жидкую среду и выращивали в термостатируемом в шейкере в течение 18 часов при +28/37⁰С (температура варьировалась в зависимости от использованного штамма, *S. rimosus*/*E. coli* соответственно) и 250 об/мин. Затем бактериальную суспензию смешивали с расплавленной агаризованной средой в соотношении 1:1 (по объему). 5 мл полученной смеси заливали верхним слоем на заранее подготовленные чашки Петри. После застывания на поверхность агара накладывали

бумажные диски, пропитанные растворами аминогликозидных антибиотиков. Культуру инкубировали в течение 18-20 часов при +28/37°C.

2.6. Определение минимальной ингибирующей концентрации аминогликозидов методом линейных разведений

Антимикробная активность аминогликозидных антибиотиков, в частности, стрептомицина, для клеток *E. coli*, экспрессирующих гены *aph*, была определена в качестве МИК (минимальной ингибирующей концентрации) при помощи метода линейных разведений. Чтобы приготовить инокулят *E. coli* BL21(DE3), содержащий рекомбинантную плазмиду pET16b:*aph(3'')*-Id, и, в качестве контроля, *E. coli* BL21(DE3):pET16b и стандартный штамм *E. coli* BL21(DE3), без добавленной плазмиды, штаммы высевали и выращивали на агаре LB, содержащем соответствующие антибиотики. Отдельные колонии собирали и переносили в пробирки, содержащие 2 мл бульона LB, после чего выращивали ночную культуру до оптической плотности $OD_{625} = 0,3$ для адаптации к стандарту 0,5 McFarland (мера плотности культуры; он соответствует значению $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), а затем разбавляли средой LB, получая конечную плотность 10^5 - 10^6 КОЕ/мл.

Для определения МИК методом разведений, 100 мкл культуры клеток добавляли к каждой из серии пробирок, содержащих двукратные разведения стрептомицина в 2 мл среды LB. Также добавляли ИПТГ (100 мкМ), чтобы индуцировать экспрессию *Aph(3'')*-Id. После инкубации культур при комнатной температуре (~ 25 °C) и 250 об/мин в течение 18 часов, значения МИК определяли как самую низкую концентрацию антибиотика стрептомицина, которая приводила к полному ингибированию роста (что определялось спектрофотометрически при OD_{625}).

2.7. Векторы, использованные для клонирования фрагментов ДНК

В исследовательских работах по клонированию фрагментов ДНК, а также при анализе экспрессии генов использовали несколько различных векторов – pET16b, pET28a и pET32a (Novagen, Германия; <https://novagen.com>). Схемы всех используемых в работе экспрессионных векторов представлены подробно на рисунках 20-22 и содержат обозначения основных структурно-функциональных элементов.

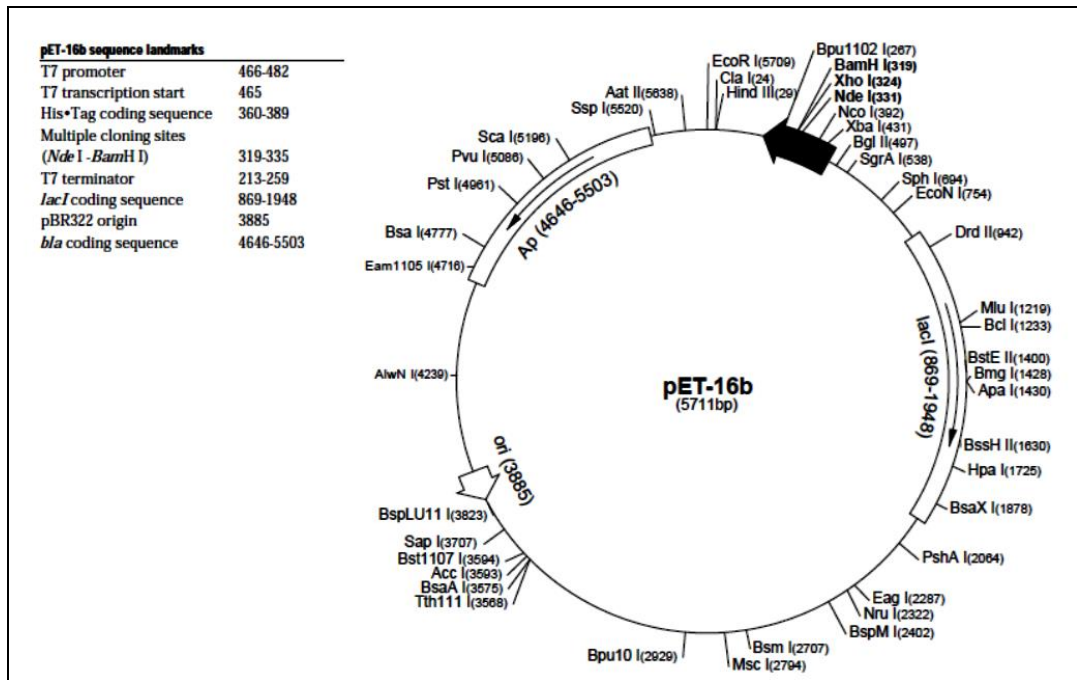


Рисунок 20. Схема экспрессионного вектора pET16b. Показаны: уникальные сайты рестрикции, ген устойчивости к ампициллину (*Ap*), ген *lacI*, «ori» pBR322 (*ori*).

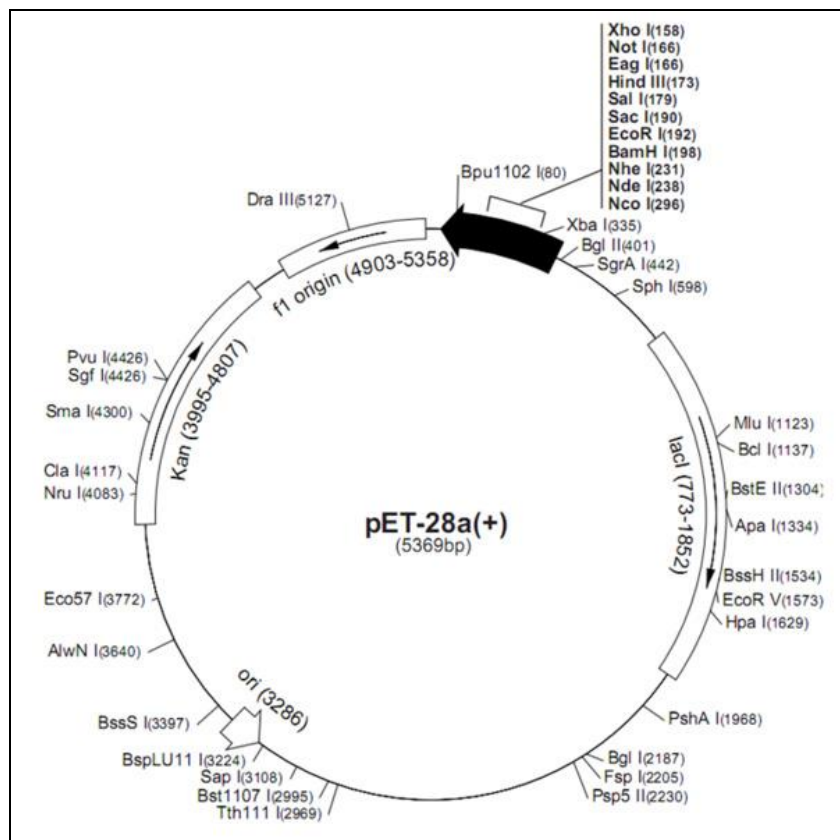


Рисунок 21. Схема экспрессионного вектора pET28a. Показаны: уникальные сайты рестрикции, ген устойчивости к канамицину (*Kan*), *ori*.

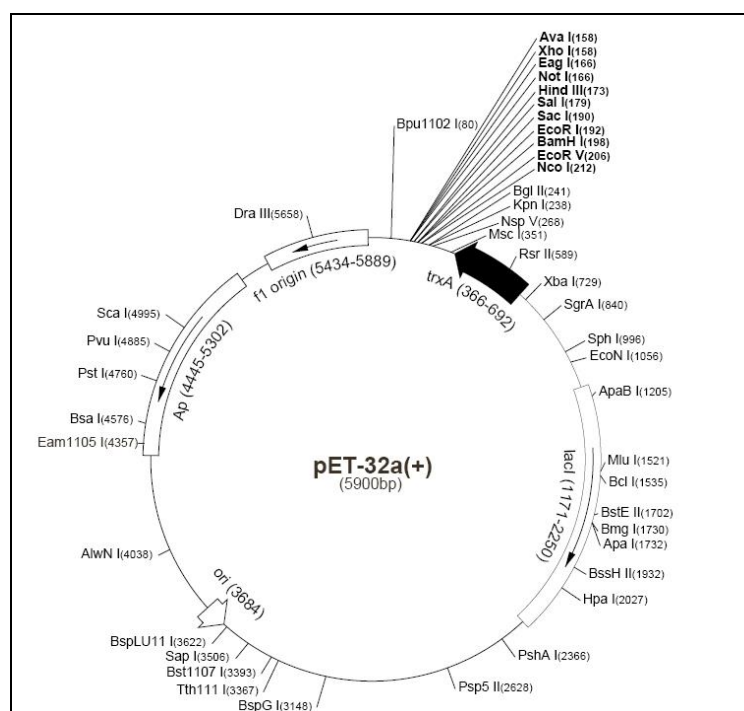


Рисунок 22. Схема экспрессионного вектора pET32a. Показаны: уникальные сайты рестрикции, ген устойчивости к ампициллину (*Ap*), *ori*.

2.8. Амплификация ДНК методом полимеразной цепной реакции

Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), описанную в [Higuchi et al., 1993], проводили с использованием набора РСК-100 (Dialat Ltd, Россия) на приборах РТС-0150 (MJ Research Inc., США) и Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология, Россия).

Использованные в работе олигонуклеотиды представлены в таблице 7.

Таблица 7. Олигонуклеотиды, использованные при клонировании генов трансфераз в штаммы *E. coli*.

Название олигонуклеотида	Структура олигонуклеотида 5' - 3'
Aph_08058-fr	TCGTCATATGGTGATCGATCTGACCGCATTC
Aph_08058-rev	AGCCGGATCCTCATCCCCAGGTCAGGGGGT
Aph_07573-fr	TCGTCATATGGTGCTGCGCTCATCCGATGT
Aph_07573-rev	AGCCGGATCCTCACTCCGTGAAGGCCGCC
PkSR1-fr	TCGCGGATCCCGCTACCAGCTCCGTGATCT
PkSR1-rev	TCGCGGATCCCGCTACCAGCTCACGCGCCG
PkSR2-fr	TCGCGGATCCCGCTACCAGCTCACGCGCCG
PkSR2-rev	CCGCAAGCTTGCGCATCTCCTCCGCGGTCTG
Aph_04805-fr	TCG TCA TAT GAT GAC GCC TGA CCA GCT TGC
Aph_04805-rev	AGC CGG ATC CTC AGT CCT CCA GGC CTC CG
Aph_16495-fr	TCG TCA TAT GAT GTC GTC GGA GCC GCA CC
Aph_16495-rev	AGC CGG ATC CTC AGT CGT CCG GTG GCC GC

Aph_16815-fr	TCGTCATATGATGAGCGACGGCACCCCTC
Aph_16815-rev	AGCCGGATCCTCAGCCTTCCTCGGCGGTC
Aph_16890-fr	TCG TCA TAT GAT GAT GGC GAT CAT GAC GGA G
Aph_16890-rev	AGC CGG ATC CCT ACT TCT CCT CCG GCC CG
Aph_27244-fr	TCG TCA TAT GAT GAG CAG CAC ACC CCG GC
Aph_27244-rev	AGC CGG ATC CTC ACC AGT AGC GGC CTT CGA
Aph_10001-fr	TCG TCA TAT GAT GAC TGA CCA CGA CGA GGT G
Aph_10001-rev	AGC CGG ATC CTC AGC CCG GCG TCT CCA TC
Aph_11866-fr	TCG TCA TAT GTT GCT CGT TGA GTT TGG TGA GG
Aph_11866-rev	AGC CGG ATC CTC AGC CCG GCG TCT CCA TC
Aph_23171-fr	TCG TCA TAT GGT GCA ATC CGT CCC GAA CAC
Aph_23171-rev	AGC CGG ATC CTC ATA TCC GCA ACT CAA CAC CG
Aph_32326-fr	TCGTCATATGATGAGCCCAGGGCAGACGC
Aph_32326-rev	AGCCGGATCC TCAGCGCTCCTCCAGCACC
Aph_33711-fr	TCGTCATATGATGACCCGACCGAGCACCAC
Aph_33711-rev	AGCCGGATCCTCAGAAGGGGTACCACCGCA
Aph_39853-fr	TCG TCA TAT GATG GGC CGG TCG ACG GAC C
Aph_39853-rev	AGC CGG ATC CCT ACG GCC GCG GGC GGC
AacSR-fv	TCGTCATATGATGACCCGACGCACACCCCT
AacSR-rev	AGCCGGATCCCTACCAGACGTCCCCACT
AacSR2-fv	TCGCGGATCCATGACCCGACGCACACCCCT
AacSR2-rev	CCGCAAGCTTCTACCAGACGTCCCCACT
T7prom	ТТААТАСГАСТСАСТАТАСГА
T7term	СТАГТТАТТГСТСАСГА
S. Tag	СГААСГССАСГАСАТАСГАСГА

T7prom, T7term – стандартные праймеры, остальные подбирали, используя программу NCBI/Primer-BLAST (www.ncbi.nih.gov/tools/primer-blast/) с использованием аннотированных нуклеотидных последовательностей генов трансфераз.

Состав смеси для ПЦР: 10×ПЦР буфер; 2.5 мМ Σ dNTPs; ДМСО; 50 мМ MgCl₂, плазмидная ДНК; 5 мкг/мкл Таq-полимераза.

Олигонуклеотидные праймеры добавляли в концентрации 20 пмоль на 100 мкл смеси.

Параметры ПЦР реакции: денатурация плазмидной ДНК при 95⁰С в течение 5 мин; затем 30 циклов амплификации: денатурация при 94⁰С в течение 1 мин, отжиг олигонуклеотидов в течение 1 мин, элонгация при 72⁰С в течение 1-2 мин, финальная элонгация фрагментов при 72⁰С в течение 10 мин.

Температурный режим отжига праймеров подбирали с учетом длины и состава праймеров согласно формуле: $T_{\text{отжига}} = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2 - 2$.

Синтез олигонуклеотидов проводила фирма Синтол, Россия.

Для проверки результатов амплификации проводили электрофорез в 1% агарозном геле. Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием маркера λ DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas, США).

Полученные образцы передавали в институт ФКНЦ Физико-химической медицины для подтверждения наличия соответствующих нуклеотидных последовательностей.

2.9. Транскрипционный анализ экспрессии генов штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970

2.9.1. Выделение тотальной РНК штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970

Для выделения РНК биомассу *S. rimosus* выращивали с использованием среды YEME до достижения первой половины log фазы (20 часов). РНК выделяли из бактериальной культуры, культивируемой с субингибирующей концентрацией антибиотиков, а также культуры без антибиотика.

Дальнейшие операции по выделению РНК проводили с использованием метода, описанного в инструкции к набору TRIzol® RNA Isolation Reagents (Invitrogen, США).

В предварительно охлажденные, осажденные центрифугированием при 8000 об/мин клетки добавляли Trizol и тщательно перемешивали на Vortex: 4 раза по 20 секунд с промежуточным охлаждением во льду в течение 30 секунд. Затем центрифугировали полученные пробы при +4 °С и 13000 об/мин в течение 1 минуты, отбирали супернатант в чистые охлажденные эппендорфы и добавляли 1 объем хлороформ-изоамилового спирта (приготовленный в соотношении 24/1). Полученные образцы центрифугировали при +4°С и 13000 об/мин в течение 5 минут, отбирали верхнюю фазу и к ней добавляли кислый фенол (рН = 4.5), тщательно перемешивали. После этого отбирали верхнюю фазу и к ней добавляли 1 объем хлороформа, центрифугировали повторно, отбирали водную фазу и добавляли 9/10 частей изопропанола и 1/10 часть 5М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ и инкубировали 10 минут при 15°С. Далее центрифугировали пробы при +4°С и 13000 об/мин в течение 10 минут, удаляли супернатант, отмывали 75% этанолом и растворяли в воде. Для удаления контаминирующей геномной ДНК использовали ДНКазу I TURBO DNA-free™ Kit каталожный номер AM2222 (Ambion, США) по протоколу производителя.

Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после чего хранили при температуре -80°С.

2.9.2. Проведение реакции обратной транскрипции

Реакцию синтеза кДНК по матрице выделенной РНК проводили при помощи набора «iScript Select cDNA Synthesis kit» (Bio-Rad, США) согласно протоколу, каталожный номер набора 1708896.

Количество полученной в ходе проведения реакции ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после хранили при температуре -20°C.

2.9.3. Амплификация ДНК в режиме реального времени

Реакцию амплификации ДНК в режиме реального времени проводили с использованием набора «qPCRmix-HS SYBR» фирмы Евроген, Россия (каталожный номер PK155L) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Использованные в работе олигонуклеотиды представлены в таблице 8.

Таблица 8. Олигонуклеотиды, использованные при амплификации генов в режиме реального времени.

Название олигонуклеотида	Структура олигонуклеотида 5' - 3'
LysR-fr	GTT CCA CAG CAC GGA CTG AAG
LysR-rev	GTA GGC GTT CCA GAG GGG AT
TetR-fr	TAG TCG CGG TAG ACG TTC GC
TetR-rev	GTC TTG AGG TCG TGC GAG TT
MarR-fr	GGC CTG CTG GAA CAG ATT C
MarR-rev	TGA AGA AAG CAT TCG GCT CG
WhiB-fr	AAG AAG ACC TCC GGG TCG TA
WhiB-rev	AAA GGG GTC TCC TGG GAG T
SR1-fr	TGA GAT CGG TGT GCC CTT CG
SR1-rev	TGC AAG ACC GTC AAG CAG CT
SR2-fr	TAG CGC CAG TCG AGC ATC CA
SR2-rev	GCC GCG ATC TTC TTC GTC CA
SR3-fr	TCA ATC CGG ACT TCC TGC CC
SR3-rev	TCC TAC TAC AAC CCG TCC GT
SR4-fr	CAT CAG AAG CGA CGG ATA CTC GCA A
SR4-rev	GTG AAC TGG TGC TTC GGA CCT TTG T
SR9-fr	GGA AAG CAG CGT CAG CGT GT
SR9-rev	CCT GGT GCA CAA CGA CCT CAA G
SR10-fr	GTC ACT GTC GAC GAG GCT G
SR10-rev	CAC GTT AGG CAG GGC TTG TG
SR11-fr	GCG CCG TTC TTC GTG ATG GA
SR11-rev	GGC GAG GAA CTG TGT CTC CTT TG
SR12-fr	ATC GAG GAG CTG CGC GGA AT
SR12-rev	CCC GTA CAC CCG AAG TCG ATC A
SR13-fr	CGA GCA CCA CCC CGT TCA
SR13-rev	GAG GTC CTC AAG CCG CGA C
GTPase Era-fr	GGA ATG ATC TCC GCC CAC TCG AT

GTPase Era-rev	GAG GTC GAC GTG ATC GGC TTC T
DNA polA-fr	GGT CTG GTT GAA GGT GGT GTG GAT AC
DNA polA-rev	GCC CAA GAC CAA GAA GAC CAA GAC C

Олигонуклеотиды подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST (www.ncbi.nih.gov/tools/primer-blast/) с использованием аннотированных нуклеотидных последовательностей генов штамма *S. rimosus* ATCC 10970.

Состав смеси для ПЦР в реальном времени: 1× буфер для ПЦР (содержащий MgCl₂), dNTPs, hot-start iTaq полимеразы, SYBR Green I. Олигонуклеотидные праймеры добавляли в концентрации 10 пмоль на 100 мкл смеси.

Подбор оптимальных условий реакции амплификации, подбирали с использованием температурного градиента на приборе Bio-Rad C1000 (BioRad, США) в режиме реального времени.

Параметры ПЦР реакции: 95⁰С – 30 сек; 95⁰С – 10 сек, 60⁰С – 30 сек, 60-95⁰С – 5 минут.

Температурный режим отжига праймеров подбирали с учетом длины и состава праймеров согласно формуле: $T_{\text{отжига}} = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2 - 2$.

Синтез олигонуклеотидов проводила фирма Евроген, Россия.

Расчет уровня экспрессии, температур плавления, а также нормирование уровней экспрессии исследуемых генов на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства GTPaseEra и DNA polA проводился с использованием коммерческой программы «Bio-Rad CFX Manager 3.1» (Bio-Rad, США). Анализ относительного уровня экспрессии проведен в трех независимых повторях.

2.10. Молекулярное клонирование

Клонирование генов трансфераз проводили в экспрессионные векторы, описанные в разделе 2.7 данной работы. Методика включала в себя такие этапы как – рестрикция, лигирование, химическая трансформация компетентных клеток, полученных с использованием растворов RF1 и RF2. Все этапы проводились по методике, описанной [Sambrook et al., 1989].

Рестрицирующие эндонуклеазы добавляли из расчета 10 ед. фермента на 1 мкг ДНК. Рестрикцию проводили в течение 1.5 часов при температуре 37⁰С, затем осаждали ДНК добавлением 0.1 объема КАС и 2.5 объема этилового спирта при -20⁰С, затем

центрифугировали, высушивали, растворяли в воде и проводили электрофорез в агарозном геле для контроля концентрации ДНК в полученных пробах.

Лигирование вектора и клонируемого фрагмента ДНК по полученным в результате рестрикции липким концам проводили с помощью фермента Т4 ДНК-лигазы (Fermentas, США). Соотношение вектора и клонируемого фрагмента в реакционной смеси составляло 1:10 по количеству молекул. Реакционная смесь для лигирования имела следующий состав: плазмидный вектор (0.2 - 0.4 мкг), фрагмент (0.4 - 0.8 мкг), лигазный буфер (1/10 объема), Т4 ДНК лигаза (30 ед). Реакцию проводили при температуре 12°C в течение 18 часов.

2.11. Определение нуклеотидной последовательности отобранных клонов (сиквенс).

Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера [Sanger et al., 1992] в Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины и в ЗАО Евроген. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.12. Метод химической трансформации

Метод химической трансформации проводили с использованием компетентных клеток бактерий по описанному ниже протоколу с использованием растворов:

RF 1: 68.9 мл H₂O, 12 мл глицерина, 10 мл 1 М KCl, 5 мл MnCl₂, 3 мл 1 М CH₃COOK, 1.11 мл CaCl₂ (pH 5.8 доводили HCl). Конечный объем полученного раствора составлял 100 мл.

RF 2: 73.7 мл H₂O, 12 мл глицерина, 8.35 мл CaCl₂, 5 мл 0.2 М MOPS, 1 мл 1 М KCl, (pH 6.5 - 6.8 доводили KOH). Конечный объем полученного раствора составлял 100 мл.

Для получения компетентных клеток *E. coli* рассеивали штамм моноклонально на чашки Петри с агаризованной средой LB, после чего в асептических условиях полученные колонии переносили в 50-миллилитровую качалочную колбу с 10 мл стерильной питательной среды LB и выращивали культуру в течение 18 часов при 37°C и 250 rpm. Затем клетки (соотношение 1:100 по объему среды) засеивали в качалочную колбу с 100 мл среды SOB и выращивали культуру при 37°C в течение 2 часов до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,6-0,8. Далее колбу охлаждали во льду 10-15 минут, центрифугировали культуру при +4°C 6000 об/мин в фальконах на 50 мл.

Полученный осадок ресуспендировали в 25 мл ледяного раствора Rf 1. Клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл

ледяного раствора Rf 2. Суспензию делили на аликвоты по 50-100 мкл и хранили при -70°C до 6 месяцев. Для проведения химической трансформации к 100 мкг суспензии компетентных клеток добавляли 0.3 мкг плазмидной ДНК и инкубировали смесь при $+4^{\circ}\text{C}$ 30 мин. После клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 2-3 мин и охлаждали на $+4^{\circ}\text{C}$ 5 мин.

Затем к суспензии клеток добавляли 1 мл среды LB и подращивали в течение 60 мин при $+37^{\circ}\text{C}$. Полученные пробы высевали на чашки с агаризованной LB и выращивали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 18 часов.

2.13. Выделение плазмидной ДНК с использованием набора Plasmid Miniprep Kit

10 мл среды LB с ампициллином (150 мкг/мл) засеивали бактериальной культурой и инкубировали в термостатированном шейкере в течение 18 часов при 37°C , 250 об/мин. Затем биомассу из 3 мл культуры собирали центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин в пробирки по 1,5 мл.

Выделение плазмидной ДНК проводили по протоколу фирмы Fermentas, США, каталожный номер набора #K0502, используя биомассу из 4.5 мл культуры.

Добавляли к клеткам *E. coli* 250 мкл ресуспенсирующего раствора и тщательно перемешивали до получения однородной суспензии. Добавляли 250 мкл лизирующего раствора и осторожно перемешивали пробу до получения вязкой консистенции суспензии. Добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора и быстро перемешивали переворотом в течение 4-6 раз. Центрифугировали 5 минут при 12 000 об/мин для отделения остатков клеток бактерий от ДНК, после чего переносили супернатант в колонки GeneJET™, избегая попадания осадка.

Центрифугировали 1 минуту при 12 000 об/мин, удаляли раствор, прошедший через колонку. Добавляли 500 мкл раствора для промывки с этанолом на колонку. Центрифугировали 30-60 секунд при 12 000 об/мин, удаляли раствор, прошедший через колонку. Повторяли данный этап еще раз для дополнительной очистки ДНК от примесей. Центрифугировали колонку без растворов в течение 30-60 секунд для удаления остатков жидкости. Переносили верхнюю часть колонки в новый эппендорф на 1.5 мл, добавляли 30-50 мкл дистиллированной воды, инкубировали при комнатной температуре 2 минуты, после чего центрифугировали еще 2 минуты. Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после чего хранили при температуре -20°C .

2.14. Выделение фрагментов ДНК из ПЦР смеси с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit

Выделение ДНК из ПЦР смеси проводили по протоколу фирмы Thermo SCIENTIFIC, США, каталожный номер набора #K0701.

Добавляли к ПЦР смеси связывающей буфер в соотношении 1:1 по объему пробы, тщательно перемешивали. Переносили суспензию в GeneJET™ колонки, центрифугировали 30-60 секунд при 12 000 об/мин, удаляли раствор, прошедший через колонку. Добавляли 700 мкл буфера для промывки (с добавлением этанола) на колонку, центрифугировали 30-60 секунд, удаляли раствор, прошедший через колонку. Центрифугировали колонку без растворов в течение 60 секунд для удаления остатков жидкости. Переносили верхнюю часть колонки в новый эппендорф на 1.5 мл, добавляли 30-50 мкл дистиллированной воды, инкубировали при комнатной температуре 2 минуты, после чего центрифугировали еще 2 минуты.

Количество выделенных фрагментов определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после хранили при температуре -20°C.

2.15. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit

Проводили электрофорез амплифицированного фрагмента в 1% агарозном геле при напряжении 120 В в течение 40 мин. В качестве контроля размера фрагмента использовали маркер λ DNA/EcoRI+HindIII («Fermentas», Литва).

Выделение фрагмента ДНК из геля с помощью набора GeneJET™ Gel Extraction Kit фирмы Thermo SCIENTIFIC, США (каталожный номер #K0691) проводили по соответствующему протоколу.

Вырезали кусочек геля, содержащий целевой фрагмент ДНК, чистым скальпелем и помещали в эппендорф на 1,5 мл. Добавляли к образцу связывающей буфер в соотношении 1:1 по объему/весу пробы. Инкубировали образец при температуре 50-60°C в течение 10 минут, постоянно помешивая переворотом, до полного растворения осадка. Переносили суспензию в GeneJET™ колонки, центрифугировали 30-60 секунд при 12 000 об/мин, удаляли раствор, прошедший через колонку. Добавляли 700 мкл буфера для промывки (с добавлением этанола) на колонку, центрифугировали 30-60 секунд, удалили раствор, прошедший через колонку. Центрифугировали колонку без растворов в течение 60 секунд для удаления остатков жидкости. Переносили колонки в новый эппендорф на 1.5 мл, добавляли 30-50 мкл дистиллированной

воды, инкубировали при комнатной температуре 2 минуты, после чего центрифугировали еще 2 минуты.

Количество выделенных фрагментов определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после хранили при температуре -20°C .

2.16. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

10 мл среды LB с ампициллином (150 мкг/мл) засеивали бактериальной культурой и инкубировали в термостатированном в шейкере в течение 18 часов при 37°C , 250 об/мин. Затем биомассу из 3 мл культуры собирали центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин в пробирки по 1,5 мл.

Выделение проводили согласно методике, описанной в работе [Sambrook et al., 1989] с использованием следующих растворов:

Раствор I: 50 мМ глюкоза, 25 мМ Трис-НСl pH 8.0, 10 мМ ЭДТА

Раствор II: 0,2 N NaOH, 1% SDS

Клетки ресуспендировали в 150 мкл раствора I. Затем добавляли 300 мкл раствора II, осторожно перемешивали и помещали в ледяную баню на 5 мин. Добавляли 300 мкл 3М раствора ацетата калия (pH 4.8), осторожно перемешивали и инкубировали во льду в течение 30 мин. Центрифугировали 10 мин, супернатант переносили в чистый эппендорф, добавляли 0.5 объема фенола и 0.5 объема хлороформа, осторожно перемешивали. Центрифугировали 5 мин, водную фазу отбирали в чистый эппендорф. Плазмидную ДНК осаждали добавлением 0.1 объема 3М ацетата калия и 2.5 объема 96% этилового спирта в течение 40 мин при -70°C , центрифугировали 15 мин. Полученный осадок промывали 500 мкл 70% этиловым спиртом, центрифугировали 5 мин, высушивали и растворяли в 30-50 мкл дистиллированной воды.

Концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после чего хранили при температуре -20°C .

2.17. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле по Лэммли

Белковый электрофорез проводили в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с помощью прибора для вертикального электрофореза фирмы Helicon (США), размер стекол 10 x 10 см [Laemmli, 1970].

Состав растворов и буферов:

- Раствор А рН 8.8 (доводили HCl): 1.5 М Трис-base; 0.1% SDS
- Раствор А' рН 6.8: 0.5 М Трис-base, 0.1% SDS
- Раствор В: 29.2% акриламид; 0.8% метилен-бисакриламид
- Sample буфер рН 6.8: 1 М Трис-HCl; 5% глицерин, 2% меркаптоэтанол, 2% SDS, бромфеноловый синий
- Лизирующий буфер рН 7.2: 50 мМ KH_2PO_4 , 1 М NaCl, 100 мМ PMSF, 0,5 М ЭДТА
- Электродный буфер рН 8.4: 0.025 М Трис-base, 0.192 М глицина, 0.1% SDS
- Фиксирующий раствор: 300 мл этанола, 80 мл 7% уксусной кислоты, 220 мл дистиллированной воды
- Раствор для окраски: 0.8 г кумаси G-250, 160 мл 96% спирта, 80 мл уксусной кислоты, 360 мл дистиллированной воды

Проведение белкового электрофореза:

Образцы вносили в лунки полиакриламидного геля. Концентрация акриламида в верхнем геле составляла 5%, в нижнем – 12%. В качестве контроля размера анализируемых белков использовали окрашенный маркер молекулярной массы белков SM0441 (Fermentas, США). Электрофорез проводили при напряжении 150 В до вхождения образцов в разделяющий гель, а затем при 180 В до выхода бромфенолового синего из геля.

По окончании фореа гель помещали на 30 мин в фиксирующий раствор. Окрашивание проводилось при нагревании красителем кумаси G-250 в течение 15-20 минут. Гель отмывали 7% уксусной кислотой при нагревании.

2.18. Измерение концентрации белка на флуориметре

Данный способ использовали для измерения низких концентраций ДНК, РНК и белка для экспериментов, требующих максимально точного количественного определения. Реагенты, поставляемые вместе с прибором, обладают способностью селективно связывать молекулу-мишень (исследуемый белок), образуя флуоресцентный комплекс. Интенсивность флуоресценции комплекса прямопропорциональна концентрации анализируемого вещества в определенном диапазоне концентраций.

Для измерения концентрации белка использовали набор Qubit® Protein Assay Kit, 500 assays (Q33212, Invitrogen, США), каталожный номер Q33212.

Приготовление рабочего раствора

В эппендорф на 1.5 мл внесли белковый буфер В и белковый реагент А в соотношении 199:1, тщательно перемешали.

Приготовление стандартов для калибровки и калибровка прибора Qubit

В 3 разные пробирки добавили по 190 мкл рабочего раствора и по 10 мкл одного из стандартов (№1, №2, №3). Аккуратно перемешали, избегая пузырьков. Инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Включили прибор. Выбрали режим измерения концентрации белков. Поставили пробирку со стандартом в ячейку прибора. Измерили по очереди каждый из трех стандартов.

Приготовление проб и измерение концентрации выделенного белка

К 200 мкл рабочего раствора добавили по 2 мкл раствора белка. Аккуратно перемешали, избегая пузырьков. Инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Поставили пробирку с приготовленной пробой в ячейку прибора. Измерили концентрацию белка в пробе. Для автоматического пересчета концентрации белка в 1 мл выбрали объем добавленной пробы белка.

2.19. Выделение и очистка Arp белков методом металлоаффинной хроматографии

Состав буферных растворов

- Лизирующий буфер (pH=8.0): 50 мМ Na₂HPO₄; 300 мМ NaCl; 10 мМ имидазола.
- Промывочный буфер (pH=8.0): 50 мМ Na₂HPO₄; 300 мМ NaCl; 50 мМ имидазола.
- Элюирующий буфер (pH=8.0): 50 мМ Na₂HPO₄; 300 мМ NaCl; 300 мМ имидазола.

Проведение выделения и очистки

Выделение и очистку белков проводили по протоколу фирмы Qiagen, Германия, каталожный номер набора Ni-NTA Spin Kit 50 – 31314. Размораживали клетки (осадок из 15 мл культуры) в ледяной бане в течение 15 минут и ресуспендировали осадок в 3 мл лизирующего буфера. Добавляли 300 мкл свежеприготовленного раствора лизоцима (10 мг/мл) и 20 мМ (4.5 мкл) 2-меркаптоэтанола и инкубировали во льду 30 минут. Затем клетки подвергали ультразвуковой дезинтеграции во льду в течение 4 минут, не допуская нагревания раствора. Центрифугировали лизат при 7830 об/мин при +4°C в течение 30 минут. Собирали супернатант.

Отбирали 50 мкл для электрофореза – проба 1. Добавляли к нему 25 мкл Sample buffer. Отбирали небольшое количество осадка – проба 2. Добавляли к нему 50 мкл PMSF buffer и

25 мкл Sample buffer. Уравновешивали Ni-NTA Spin колонки промывкой 600 мкл лизирующего буфера с центрифугированием при 2900 об/мин при +4°C в течение 2 минут (колонки при всех центрифугированиях не закрывали крышками). 700 мкл отобранных лизатов, содержащих 6х His-Tag белок, вносили в уравновешенные Ni-NTA Spin колонки. Центрифугировали при 1600 об/мин при +4°C в течение 5 минут. Собирали проскок – проба 3. Процедуру повторяли 4 раза. Промывали Ni-NTA Spin колонки 600 мкл промывочного буфера с центрифугированием в течение 2 минут при 2900 об/мин при +4°C 3 раза. Каждый раз переносили колонку в новую нижнюю пробирку. Собирали отмывочные фракции – пробы 4-5.

Элюировали белок 2 раза по 200 мкл элюирующего буфера с центрифугированием при 2900 об/мин при +4°C в течение 2 минут. Отбирали пробы 6-7.

Добавляли ко всем пробам по 25 мкл Sample buffer.

В ходе очистки белка отобрали 8 проб:

- 1) Лизат; 2) Осадок; 3) Проскок; 4) Отмывка-1; 5) Отмывка-2; 6) Элюат-1;
- 7) Элюат-2.

2.20. Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа

Подготовку образцов для масс-спектрометрического анализа проводили по методике описанной [Shevchenko et al., 2006], а также рекомендованной фирмой Promega, США (in gel digestion protocol). Фрагмент геля, содержащий исследуемый белок, вырезали и передавали для проведения масс-спектрометрического анализа в институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН) для подтверждения соответствия аминокислотных последовательностей исследуемых белков.

2.21. Анализ фосфотрансферазной активности белков *in vitro*

Для анализа фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro* использовали два метода:

- 1) метод тонкослойной хроматографии с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ для идентификации ^{32}P -меченного стрептомицинофосфата;
- 2) метод с использованием люминесцентной реакции, основанный на определении фосфотрансферазной активности по количеству АТФ, оставшегося в ходе реакции.

2.21.1. Метод тонкослойной хроматографии

Для анализа фосфотрансферазной активности белка Aph(3^{''})-Id *in vitro* применяли метод тонкослойной хроматографии с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ для идентификации ^{32}P -меченного стрептомицин-фосфата.

Реакцию проводили в буфере, содержащем 4 мМ NaHCO_3 , 20 мМ Трис- HCl (pH 7.8), 10 мМ MgCl_2 , 60 мМ KCl , и 3 мМ ДТТ. Вносили 0.3 мкг белка Aph(3^{''})-Id, стрептомицин (400 мкг/мл, 800 мкг/мл и 1200 мкг/мл соответственно) и АТФ до конечной концентрации 5 мМ (содержащего 5 Бк/пмоль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Конечный объем смеси составлял 30 мкл. В качестве отрицательных контролей использовались пробы без добавления антибиотика, а также пробы, в которых стрептомицин был заменен на канамицин (1200 мкг/мл). После инкубации при температуре 28°C в течение 5-10 минут образцы наносили на полиэтиленмин-целлюлозную пластину для тонкослойной хроматографии (Merck). Хроматографию проводили в 50 мМ KH_2PO_4 буфере (pH 5.4), затем пластины высушивали при комнатной температуре и экспонировали с рентгеновской пленкой в течение 15 минут.

2.21.2. Метод с использованием люминесцентной реакции

Исследование фосфотрансферазной активности Aph белков также проводили *in vitro* с использованием набора Kinase-Glo⁺ Plus Luminescent Kinase Assay, каталожный номер V3772 (Promega, США). Фосфотрансферазную активность определяли по величине фосфорилирования аминогликозидного антибиотика, измеряя количество АТФ, оставшейся в ходе реакции.

Реакцию проводили в течение 30 минут при комнатной температуре в буфере, содержащем 15 мМ HEPES (pH 7.4), 20 мМ NaCl , 0.5 М ЭДТА, 0.02% Tween-20, 0.01% БСА, 10 мМ MgCl_2 . Для анализа фосфотрансферазной активности предварительно определяли оптимальное количество Aph-белка, АТФ и антибиотика. Белок Aph вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 25 нг на точку. В каждую лунку добавляли АТФ до конечной концентрации 100 мкМ и аминогликозидный антибиотик в концентрациях 0.3, 0.6, 1, 2, 3 мкг на точку соответственно. Перемешивали содержимое лунок. Конечный объем смеси в лунке составлял 50 мкл. Каждую пробу ставили в четырех повторностях. В качестве контроля использовали пробы, содержащие субстраты (АТФ и стрептомицин) и киназный буфер. Реакцию останавливали добавлением равного объема реагента kinase-Glo, затем инкубировали планшет 10 минут при комнатной температуре. После измеряли люминесцентный сигнал при помощи прибора DTX 880 Multidome Detector (Beckman Coulter, США). Параметры измерения: время 1000 мс, чувствительность измерения – expected high activity.

2.22. Исследование автофосфорилирования аминокликозидфосфотрансфераз *in vitro*

Исследование способности рекомбинантного белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию *in vitro* проводили с использованием двух методов:

- 1) инкубацией с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
- 2) с использованием люминесцентной реакции, величину автофосфорилирования определяли, измеряя количество АТФ, оставшегося в ходе реакции.

2.22.1. Метод с инкубацией $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

Белок инкубировали с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ в течение 15 минут при температуре 28°C в буферном растворе, содержащем 4 мМ NaHCO₃, 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 10 мМ MgCl₂, 60 мМ KCl и 3 мМ ДТТ. Вносили 2 мкг Aph-белка и АТФ до конечной концентрации 10 мкМ (содержащего 10 Бк/пмоль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$). Конечный объем смеси составлял 30 мкл. Реакцию останавливали добавлением 5x Sample buffer. Далее проводили электрофорез меченых белков в SDS-ПААГ. Для регистрации меченых белков полученный SDS-ПААГ экспонировали с рентгеновской пленкой KODAK MXG Film (100sh).

2.22.2. Метод с использованием люминесцентной реакции

Также исследование автофосфорилирования проводили с использованием набора Kinase-Glo⁺ Plus Luminescent Kinase Assay, каталожный номер V3772 (Promega, США). Величину автофосфорилирования определяли, измеряя количество АТФ, оставшейся в ходе реакции.

Белок Aph вносили в лунки 96-луночного планшета в количествах 5, 25, 50 и 75 мкг на точку по 15 мкл раствора. В каждую лунку добавляли 15 мкл АТФ, перемешивали содержимое лунок. Реакцию проводили в течение 40 минут при комнатной температуре в буфере, содержащем 15 мМ HEPES (рН 7.4), 20 мМ NaCl, 0.5 М ЭДТА, 0.02% Tween-20, 0.01% БСА, 10 мМ MgCl₂. Реакцию останавливали добавлением равного объема реагента kinase-Glo, затем инкубировали планшет 10 минут при комнатной температуре. После измеряли люминесцентный сигнал при помощи прибора DTX 880 Multidome Detector (Beckman Coulter, США). Параметры измерения: время 100 мс, чувствительность измерения – expected high activity.

2.23. Нарботка биомассы штамма *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET16b:*aph* в ферментере для последующей кристаллизации белков

С целью выделения белка в количествах, необходимых для дальнейших структурно-функциональных исследований, проводили наработку биомассы штамма *E. coli* BL21(DE3)

pET16b:*aph(3'')*-*Id* в ферментере LiFlus GX объемом 5 литров (Biotronix, Корея), содержащем 4 литра среды LB с глюкозой.

Экспрессию контролировали с помощью электрофореза в 12% полиакриамидном геле.

Из полученной биомассы выделяли рекомбинантные белки в нативной форме в препаративных количествах. Для концентрирования белка использовали колонки Amicon (Millipore).

2.24. Биоинформатические методы анализа аминокликозидфосфотрансфераз

Последовательности генов аминокликозидфосфотрансфераз штамма *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 и кодируемые ими аминокислотные последовательности были получены из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA182749/>).

При выполнении работы использовали несколько баз данных:

- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) для проведения биоинформатического анализа, определения окружения генов *aph*;
- PDB (<https://www.rcsb.org/>) для анализа трехмерных структур.

Для белков, кодируемых данными генами, определяли доменную структуру и анализировали их пространственную организацию (с использованием вышеописанных баз данных).

Для выявления потенциальных сайтов фосфорилирования применяли программы:

- NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>);
- NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>);
- NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>);
- NetPhosBac 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosBac/>).

Для вычисления изоэлектрической точки исследуемых белков пользовались программой ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Поиск гомологичных белков с известной 3D структурой проводили по программе SAS (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>).

Для проведения сравнительного и филогенетического анализа использовали программу Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Для визуализации выравнивания использовалась программа GeneDoc (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>). Проценты идентичности рассчитывались по программе BLAST. Построение филогенетического дерева

проводили в пакете программ MEGA 6.0.6 (<https://www.megasoftware.net/>), где для выравнивания последовательностей использовали алгоритм ClustalW, а реконструкцию дерева проводили методом ближайших соседей (neighbor-joining, NJ) используя модель p-distance и применяя бутстреп-анализ (1000 репликаций) для оценки достоверности полученной топологии дерева.

Для статистической обработки полученных данных также пользовались программами Statistica V6 и Microsoft Office Excel.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Изучение спектра устойчивости к аминогликозидам штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970

Ранее при изучении спектра устойчивости к антибиотикам у 110 штаммов рода *Streptomyces* было показано, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 единственный среди изученных, обладает устойчивостью к большинству аминогликозидных антибиотиков в концентрации 10-20 мкг/мл [Даниленко и др., 1977]. В данном исследовании проводили сравнительный анализ устойчивости штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и модельного штамма *S. lividans* 66 к аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков, таблица 9.

Таблица 9. Анализ спектра устойчивости к аминогликозидам штаммов *S. rimosus* ATCC 10970 и *S. lividans* 66.

Название антибиотика	Концентрация, мкг/диск	Диаметр зоны подавления роста, мм	
		<i>S. rimosus</i>	<i>S. lividans</i>
Канамицин	30	17±0,4	30±0,8
Неомицин	30	10±0,3	18±0,7
Амикацин	30	16±0,5	22,5±0,7
Стрептомицин	10	13±0,5	26±0,8
Гентамицин	10	14±0,5	23±0,7
Тобрамицин	10	17±0,6	25,5±0,8
Сизомицин	10	13±0,4	20±0,8
Нетилмицин	10	15±0,5	22,5±0,8
Изепамицин	30	17±0,5	26±0,8
Спектиномицин	100	8±0,3	27±0,8
Паромомицин	30	7±0,3	20,5±0,8
Гигромицин	30	6,5±0,3	30±0,8

*Примечание. Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений ± стандартные отклонения.

В результате было установлено, что штамм *S. rimosus* более устойчив к аминогликозидам по сравнению со штаммом *S. lividans*, что согласуется с полученными ранее экспериментальными данными.

3.2. Биоинформатический анализ *aph*-генов штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970

В университете Стратклайд в Великобритании было проведено полногеномное секвенирование [Pethick et al., 2013] штамма *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, из которого ранее был клонирован ген *aph(3')-VIII* [Потехин и Даниленко, 1985; Sizova et al., 2001]. При биоинформатическом анализе в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 было выявлено 14 генов аминогликозидфосфотрансфераз, обозначенных нами как *aphSR1-14* (таблица 10).

Таблица 10. Наличие *aph*-генов у *S. rimosus* ATCC 10970.

№	Название	Локус-таг	Контиг
<i>aphSR1</i>	Белок семейства трансфераз	SRIM_04805	contig00009
<i>aphSR2</i>	Аминогликозид фосфотрансфераза	SRIM_07573	contig00016
<i>aphSR3</i>	Аминогликозид фосфотрансфераза <i>aph(3'')-Id</i>	SRIM_08058	contig00017
<i>aphSR4</i>	Аминогликозид фосфотрансфераза	SRIM_10001	contig00025
<i>aphSR5</i>	Аминогликозид фосфотрансфераза <i>aph(3')-VIII</i>	SRIM_10156	contig00025
<i>aphSR6</i>	Аминогликозид фосфотрансфераза	SRIM_11866	contig00031
<i>aphSR7</i>	Гипотетический белок SRIM_16495	SRIM_16495	contig00054
<i>aphSR8</i>	Фосфотрансфераза	SRIM_16815	contig00056
<i>aphSR9</i>	Трансфераза	SRIM_16890	contig00056
<i>aphSR10</i>	Аминогликозид фосфотрансфераза	SRIM_23171	contig00096
<i>aphSR11</i>	Фосфотрансфераза	SRIM_27244	contig00135
<i>aphSR12</i>	Фосфотрансфераза	SRIM_32326	contig00198
<i>aphSR13</i>	Гипотетический белок SRIM_33711	SRIM_33711	contig00218
<i>aphSR14</i>	Гипотетический белок SRIM_39853	SRIM_39853	contig00361

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей *aph*-генов *S. rimosus* ATCC 10970 показал, что они имеют низкую гомологию друг с другом (26-36%), таблица 11. Наибольшую идентичность (сходство) - 36 (49) % с *Aph(3')-VIII* имеет *AphSR3*.

Таблица 11. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей 14 аминокликозид-фосфотрансфераз штамма *S. rimosus* ATCC 10970.

aphSR №	1	2	3	4	5 – <i>aphVIII</i>	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	23 (45)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	23 (39)	21 (40)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	21 (47)	21 (44)	20 (38)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 - <i>aphVIII</i>	23 (37)	19 (41)	34 (55)	24 (43)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	19 (40)	21 (39)	24 (41)	24 (47)	24 (42)	100	-	-	-	-	-	-	-	-
7	23 (42)	24 (41)	22 (40)	22 (43)	26 (44)	21 (41)	100	-	-	-	-	-	-	-
8	21 (40)	22 (46)	22 (38)	25 (43)	23 (44)	19 (40)	23 (43)	100	-	-	-	-	-	-
9	21 (45)	25 (46)	22 (44)	25 (44)	21 (43)	22 (41)	23 (41)	23 (42)	100	-	-	-	-	-
10	20 (45)	26 (45)	23 (45)	27 (45)	25 (44)	23 (44)	25 (41)	24 (39)	26 (47)	100	-	-	-	-
11	21 (44)	22 (43)	20 (45)	23 (45)	19 (43)	23 (41)	23 (45)	28 (50)	21 (42)	21 (41)	100	-	-	-
12	20 (45)	24 (46)	21 (40)	23 (44)	22 (46)	22 (42)	24 (40)	26 (44)	26 (48)	22 (43)	23 (42)	100	-	-
13	27 (47)	28 (40)	22 (44)	24 (43)	24 (43)	21 (43)	23 (39)	23 (40)	24 (45)	25 (48)	23 (42)	27 (49)	100	-
14	25 (44)	21 (35)	25 (42)	25 (43)	23 (42)	26 (44)	25 (38)	21 (37)	23 (43)	16 (25)	21 (36)	28 (42)	26 (45)	100

При биоинформатическом анализе четырнадцати *aph*-генов определяли: генетическое окружение и расположение в кластере, межгенное пространство, протяженность в нуклеотидах.

Для белков, кодируемых данными генами, определяли: протяженность в аминокислотах, молекулярную массу, изоэлектрическую точку, доменную структуру и потенциальные сайты фосфорилирования. По программе BLAST определяли гомологию аминокислотной последовательности белков с последовательностями Aph белков других видов и родов актинобактерий. По программе SAS предсказывали структуру белков и определяли гомологию с известными трехмерными структурами аминокликозидфосфотрансфераз.

Все исследуемые белки содержат домены "APH". У AphSR3, AphSR5 (AphVIII), AphSR8, AphSR11 и AphSR12 аннотированы также "Активные сайты", "АТФ-связывающие сайты" и "Антибиотик-связывающие сайты".

По программе UniProt аннотированы молекулярные функции белков. Функции белков AphSR3 и AphSR5 (AphVIII) – АТФ-связывание, киназная активность, фосфотрансферазная

активность. Функция белков AphSR7, AphSR13 и AphSR14 не охарактеризована. Возможная функция остальных белков – трансферная активность.

Обобщенные результаты биоинформатического анализа представлены в таблице 12. Для тринадцати AphSR, кроме AphSR5 (AphVIII), представлены ближайшие гомологи по аминокислотной последовательности из актинобактерий – продуцентов аминогликозидных антибиотиков.

Таблица 12. Результаты биоинформатического анализа аминогликозидфосфотрансфераз штамма *S. rimosus* ATCC 10970.

Aph	Размер белка		pI	Гомология по а/к последовательностям		Гомология по 3D структурам	
	а/к	кДа		Гомологи	% идент. (% сх-ва)	Гомологи	%
AphSR1	312	33,19	4,86	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	82 (88)	отсутствуют	—
AphSR2	346	38,14	9,09	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	92 (93)	фосфотрансфераза rv3168 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31,2
						спектиномицин-фосфотрансфераза Aph(9)-Ia	22,7
AphSR3	272	29,81	4,56	стрептомицин-фосфотрансфераза <i>Streptomyces griseus</i>	66 (75)	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза IIa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39,4
AphSR4	320	34,69	4,82	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces griseus</i>	79 (86)	аминогликозид-фосфотрансфераза Aph(4) <i>Escherichia coli</i>	26,7
AphSR5	267	29,20	4,54	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза VIII <i>Streptomyces rimosus</i>	100 (100)	аминогликозид-3'-фосфотрансферазы VIII <i>Streptomyces rimosus</i>	100
				аминогликозид-3'-фосфотрансфераза <i>Streptomyces fradiae</i>	59 (69)	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза IIa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39,2
AphSR6	280	29,64	5,06	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces griseus</i>	43 (50)	отсутствуют	—

AphSR7	358	38,48	6,32	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	84 (86)	отсутствуют	—
AphSR8	357	38,43	5,18	фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	91 (92)	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Ralstonia eutropha</i>	35,6
						фосфотрансфераза rv3168 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28,1
AphSR9	302	31,68	4,92	фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	86 (90)	гентамицин устойчивый белок aph(2')-II <i>Enterococcus gallinarum</i>	23,9
AphSR10	297	31,70	9,48	фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	81 (84)	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза IIa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49,0
AphSR11	366	40,97	6,42	фосфотрансфераза <i>Streptomyces monomycini</i>	90 (92)	фосфотрансфераза rv3168 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42,8
						аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Ralstonia eutropha</i>	26,8
AphSR12	299	31,76	4,83	фосфотрансфераза <i>Streptomyces fradiae</i>	81 (85)	Aph(2'')-IVa <i>Enterococcus casseliflavus</i>	22,1
AphSR13	296	32,19	5,94	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces antibioticus</i>	76 (82)	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза IIa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27,1
AphSR14	446	46,91	6,11	аминогликозид-фосфотрансфераза <i>Streptomyces fradiae</i>	61 (65)	Отсутствуют	—

Было построено филогенетическое древо (рисунок 23), включающее 14 аминогликозид-фосфотрансфераз штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и описанные ранее [Shakya et al., 2011] аминогликозидфосфотрансферазы из клинических изолятов и штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков, относящиеся к подсемействам: Aph(2''), Aph(3'), Aph(3''), Aph(4), Aph(6), Aph(7'') и Aph(9). На основании филогенетического сходства проведена классификация *aph*-генов штамма *S. rimosus*.

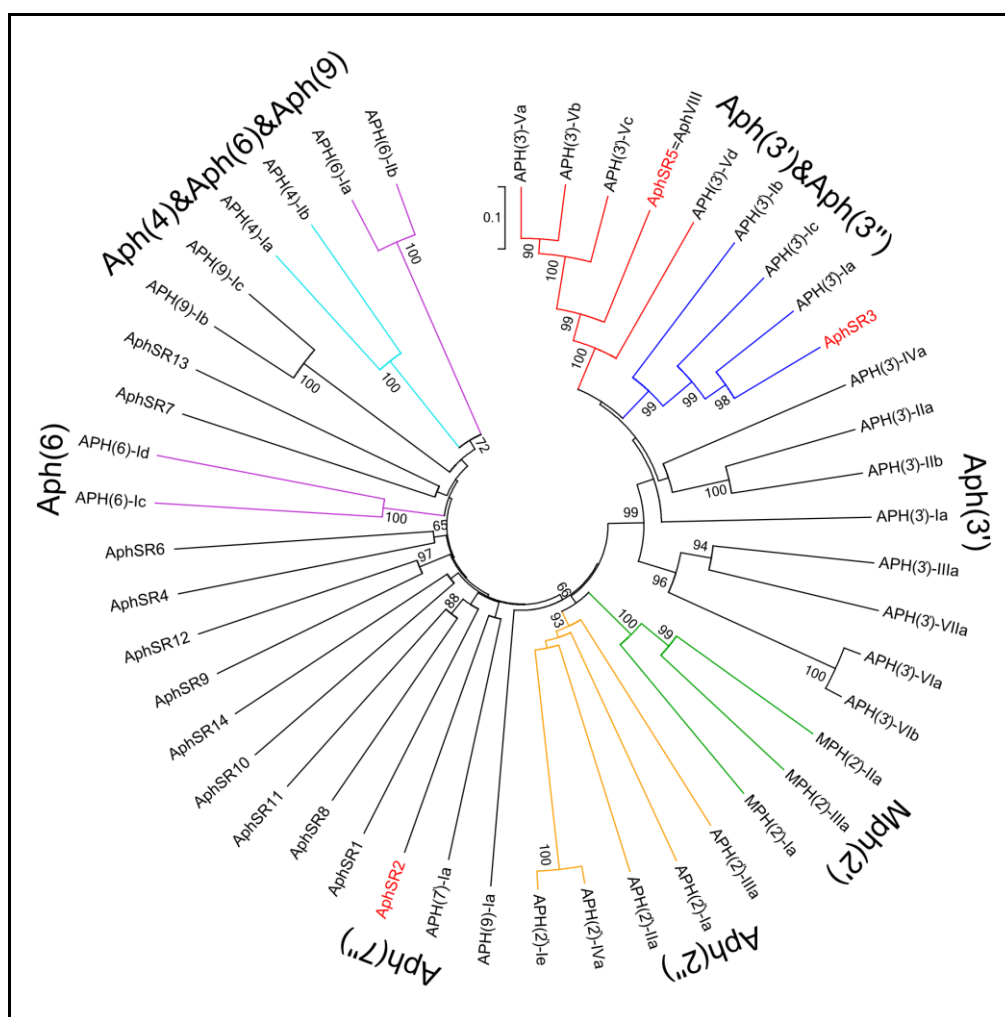


Рисунок 23. Филогенетическое дерево, построенное на основе выравнивания последовательностей аминогликозидфосфотрансфераз. Цветом обозначены кластеры, соответствующие различным подсемействам Aph. В узлах дерева приведены бутстреп-оценки, значения менее 60% не указаны. Красным цветом выделены аминогликозидфосфотрансферазы, обсуждаемые в тексте.

Филогенетический анализ подтвердил, что AphSR5 (AphVIII) относится к подсемейству Aph(3'). AphSR3 можно отнести к подсемейству Aph(3'') – это следует из расположения данных фосфотрансфераз в кластерах, относящихся к указанным подсемействам, и подтверждается высоким бутстреп-значением соответствующих узлов дерева (98-99%). Гены *aph*, относящиеся к подсемейству Aph(3''), являются стрептомицин фосфотрансферазами и ранее были описаны *aph(3'')-Ia* у продуцента стрептомицина *Streptomyces griseus* [Trower and Clark., 1990], *aph(3'')-Ib* на плазмиде RSF1010 *Escherichia coli* [Scoltz et al., 1989] и *aph(3'')-Ic* у *Mycobacterium fortuitum* [Ramon-Garcia et al., 2006]. Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей показал наличие у AphSR3 всех консервативных мотивов, характерных для подсемейства Aph(3''), что позволило нам обозначить её как Aph(3'')-Id (рисунок 24).

AphSR3	: MIDLTAF-LTLLRADGGDAGWEFVTTGESGAAVFRSADGSRVYAKCVFADQVAAEAERDRVSNLSTQIIP	: 69
APH_3"-Ia	: MSDHPGPGAVTPELFGVGGDWLAVTAGESGASVFRADATRYAKCVPAADAAGTEAERDRIAWLSGQVVP	: 70
APH_3"-Ib	: ~~~~~MNRTNIFFGESHSDWLFVVRGEGSDVFRRGDGHAFKTIAPASRRGELAGERDRLIWLKGRGVA	: 64
APH_3"-Ic	: ~~~~~MTEWLVVTRGEGSAGVFRNSDGSSYAKVVDAAAVADAAERDRVSNAAHRHGVP	: 53
AphSR3	: GPRVLDWRVG-AAGAGLITSTVEGIEPADRASASMTAAWEIFADAVRRLEELPPEKCPHTRFEGEMFSMA	: 138
APH_3"-Ia	: GPRVLDWYAG-DAGACLVTAVGVEADRVGADLLRTAWGAVADAVRRLEHVPVASCPEHRRGLDSVVDAA	: 139
APH_3"-Ib	: CPEVINWQEE-QEGACLVITATRGVFPADLSGADLLKAWPSMGQCIQAVHSTISVDQCPHERRSRMFGRA	: 133
APH_3"-Ic	: GEAVIDWRVTEDEGACLITSTVIRGVAADRLSESAIIRAAPPAIVEAVRILHALPADGCPYRRLLDDMLARA	: 123
AphSR3	: RDVVAREAVNEDFTPEECRHTPEGELTARLAFYVGRRLAQBAQTVVCHGDLICLPNIITIDEDTLDVACFI	: 208
APH_3"-Ia	: RDVARGAVHEEFTPEVQRVLPALLETARLTGELARRRQBAADTVVCHGDLICLPNIIVLHEPETLEVSCFI	: 209
APH_3"-Ib	: VDVVSRNAVNEDFTPEELRSTELHLLARVERELPVRLLQERTDMVVCHGDCMCMNFVVDPKTLQCTGLI	: 203
APH_3"-Ic	: RAVVGAGAVNEEFTSDEDEVEAEALIRVEREADIRRRREAADVVVCHGDLICLPNIIVLDRHTVECFI	: 193
AphSR3	: DLGRLGRALPYADLALLAATARETWGDDERWSQSAEEFFAARYGIALDRDRERFYHLDPDPLTWG	: 272
APH_3"-Ia	: DLGRLGADRHADLALLANARETWVDEERA-RFADAFAERYGIAPDPERLRFYHLDPDPLTWG	: 272
APH_3"-Ib	: DLGRLGTADRYADLALMTANAENWAAPDEAERAFVLFNVLGIEAPDRERLAFYLRDPLDPLTWG	: 267
APH_3"-Ic	: DLGRLGIADRHADLALLANTADTVPG---FAEEATAGLAAGYPAQVDPRLRFYALDPLDPLTWG	: 254

Рисунок 24. Сравнение аминокислотных последовательностей AphSR3, Aph(3")-Ia, Aph(3")-Ib и Aph(3")-Ic. Консервативные остатки выделены черным.

AphSR2 расположена на одной ветви с Aph(7")-Ia, но бутстреп-поддержка соответствующего узла дерева невелика (< 60%). Ген *aph(7")-Ia* ранее был описан у продуцента гигромицина *Streptomyces hygroscopicus* [Zalacain et al., 1987]. Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей показал, что данные последовательности содержат ряд консервативных аминокислотных остатков, отличающих их от других Aph (рисунок 25).

APH_7"-Ia	: ~~~~~MQESLILDDRIDSQDSYASLRNDQEFWELARRALDELGLPVEVVRVPGE	: 52
AphSR2	: MLRSSDVRTAAPPDGHTLGSLLRRYGAGEPLSCVPAEGLLNHGRLATHGRYFLKHLDCQAAI-----ARCHRATRFUGALGLEVAEPADADG	: 93
APH_7"-Ia	: STNFIIVGEPDFVIKL-FGSHWCCPESEASEAYVLADAPVVPRLLRGELRPGTGAWPWPYLVMRMTGTTWRSAMDGTTDRNALLALARGLGRVI	: 151
AphSR2	: RIVTVIGRCYALHPWVEGRERDCAALT-----RHQSRCLGALM	: 132
APH_7"-Ia	: GRILRVPL-----TNDVLTTHS-----GVFPEITRE----RAATVEDHRGWYVSP-RITLLEDWLEDVDTLAGREPRFVHGDTHGTNIFV	: 231
AphSR2	: GCVHTALEQVITPDTPEGVPYEEAGADPARTFEMIDELALARRSAPRSQFDELAEHRTERRRLLREAHRRFGADRV---PATCWWHGDPEPINLILY	: 229
APH_7"-Ia	: DLAAEIVTGIIVDFDVIYAGD-----SRYSIVQLHLNAFRG----DREILAAIIDGAGWKRTEDEARELLAETFLHDFEVFEETPLD	: 308
AphSR2	: RDA--EPAATVDWDRILAVQPRAEAEVRAAAIFFVQPAQTLDPKVGAYAGAYRRASGAGAELAAAVHRVWWRRLNDFWMLDWRVRLGD-----RRA	: 319
APH_7"-Ia	: LSGFTDPEELAQFLVGPDDTTPGQ----	: 332
AphSR2	: DPCGPAAAAL-AVWWTREYGAVERAFTE	: 346

Рисунок 25. Сравнение аминокислотных последовательностей Aph(7")-Ia и AphSR2. Консервативные остатки выделены черным.

Остальные 11 аминогликозидфосфотрансфераз нельзя отнести ни к одному из описанных выше подсемейств, так как они расположены на дереве вне их кластеров.

Таким образом, из 14 *aph* генов только 3 гена – *aphSR5* (*aphVIII*), *aphSR3* и *aphSR2* можно отнести к известным подсемействам. Для последующего клонирования в *E. coli* на данном этапе работы были выбраны гены: *aphSR3*, обозначенный как *aph(3'')-Id* и *aphSR2*. Биоинформатический анализ генов *aphSR3* и *aphSR2* представлен в разделах 3.3.1 и 3.4.1.

3.3. Аминогликозидфосфотрансфераза *aph(3'')-Id* (*aphSR3*) – биоинформатические, функциональные и структурные характеристики

3.3.1. Биоинформатический анализ гена *aph(3'')-Id*

Ген *aph(3'')-Id* находится в активном кластере регуляторных генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам разных классов, стрессовым ответом и метаболизмом, информация представлена в таблице 13.

Таблица 13. Локализация гена *aph(3'')-Id* и его окружение.

Название гена и кодируемого им белка	Идентификатор из GenBank	Locus_tag	Позиции начала и конца в хромосоме или плазмиде
Оксигеназа	ELQ83804.1	SRIM_08008	12109 – 13098
Гипотетический белок	ELQ83805.1	SRIM_08013	13681 – 14310
Белок ET79	ELQ83806.1	SRIM_08018	14544 – 15044
Гипотетический белок	ELQ83807.1	SRIM_08023	15091 – 17799
Белок ET79	ELQ83808.1	SRIM_08028	18168 – 19100
Гипотетический белок	ELQ83809.1	SRIM_08033	19178 – 19702
LysR, семейство регуляторов транскрипции	ELQ83810.1	SRIM_08038	19717 – 20586
β-лактамаза	ELQ83811.1	SRIM_08043	20699 – 21673
RimK (глутаминилтрансфераза)	ELQ83812.1	SRIM_08048	21806 – 22834
RimK (глутаминилтрансфераза)	ELQ83813.1	SRIM_08053	22831 – 23646
<i>aph(3'')-Id</i>	ELQ83814.1	SRIM_08058	23654 – 24472
Регуляторный белок TetR	ELQ83815.1	SRIM_08063	24583 – 25257
Монооксигеназа	ELQ83816.1	SRIM_08068	25308 – 26453
Гипотетический белок	ELQ83817.1	SRIM_08073	26473 – 27633
TetR, семейство регуляторов транскрипции	ELQ83818.1	SRIM_08078	27718 – 28287
Гипотетический белок	ELQ83819.1	SRIM_08083	28757 – 31375
Транспортный белок	ELQ83820.1	SRIM_08088	31912 – 33141
ГТФ-циклогидролаза	ELQ83821.1	SRIM_08093	33235 – 33432
Гипотетический белок	ELQ83822.1	SRIM_08098	33611 – 33763
семейство SAM белков	ELQ83823.1	SRIM_08103	33763 – 34497

Исследуемый ген имеет номер в GenBank ELQ83814.1 и включает 819 п.н. Белок, кодируемый данным геном, состоит из 272 аминокислотных остатков. Молекулярная масса составляет 29.812 кДа, изоэлектрическая точка $pI=4.56$. Доменная структура белка представлена каталитическим доменом, АТФ-связывающим доменом и субстратсвязывающим карманом. С помощью программ NetPhos 2.0, NetPhosK определены потенциальные сайты фосфорилирования по остаткам серина, треонина, тирозина. С вероятностью $>90\%$ фосфорилирование может происходить по аминокислотным остаткам S₆₁, S₆₄, S₉₉, S₂₄₀, S₂₄₂, Tyr₂₁₉. На основании проведенного биоинформатического анализа был составлен паспорт гена *aph(3'')-Id* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и кодируемого им белка (Приложение 1).

3.3.2. Изучение экспрессии гена *aph(3'')-Id* в *Escherichia coli*

Для клонирования гена *aph(3'')-Id* (*aphSR3*) в штаммы *E. coli* использовали экспрессионный вектор pET16b. На рисунке 26 представлена схема клонирования гена *aph(3'')-Id* в штаммы *E. coli*.

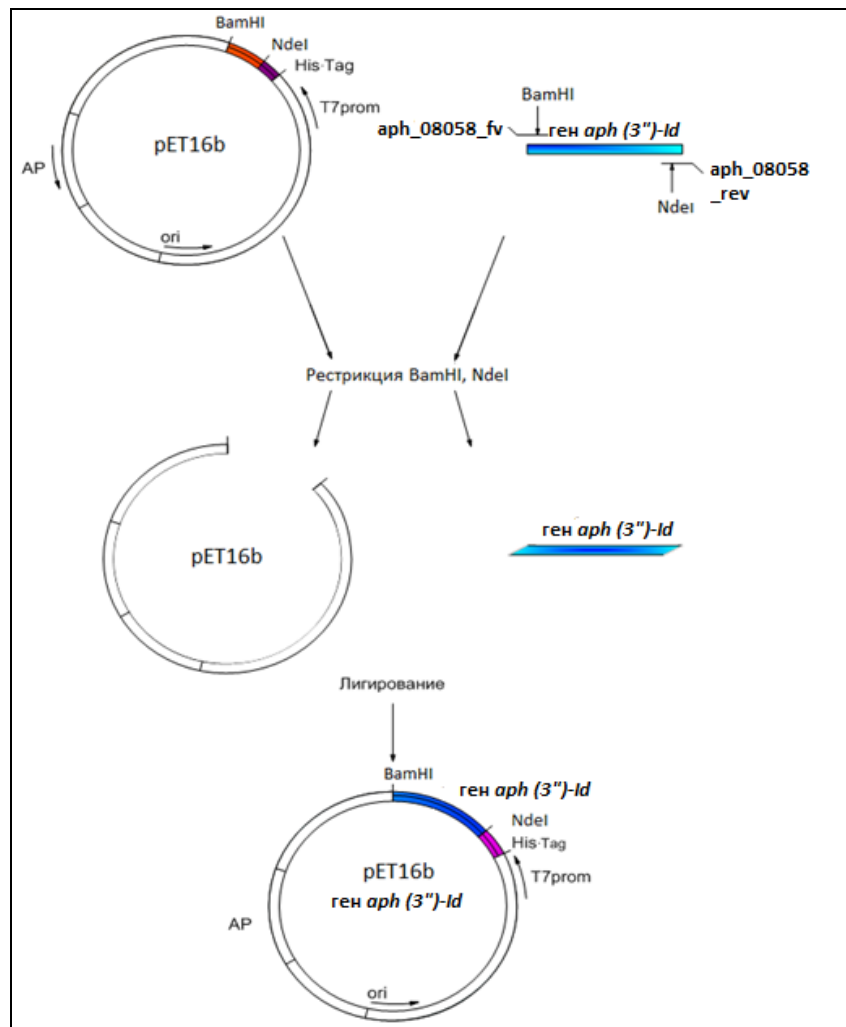


Рисунок 26. Схема клонирования гена *aph(3'')-Id* в штаммы *E. coli* в составе экспрессионного вектора pET16b.

Наработку фрагмента, содержащего ген *aph(3'')-Id*, проводили путем амплификации с хромосомной ДНК штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. Для амплификации были синтезированы олигонуклеотиды Aph_08058-fr и Aph_08058-rev, гомологичные N- и C-концевым областям гена, содержащие в своем составе сайты для рестриктаз NdeI и BamHI.

Для проверки результатов амплификации проводили электрофорез в 1% агарозном геле. Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием маркера λ DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas, США).

Амплифицированные фрагменты были препаративно выделены из агарозного геля и клонированы в составе экспрессионного вектора pET16b под контроль транскрипционного и трансляционного сигналов бактериофага T7 в рамке считывания с ATG экспрессионного участка по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI. Полученной лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5a. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР.

Результаты скрининга учитывали путем анализа электрофореза в 1% агарозном геле, все анализируемые клоны содержали целевую генетическую конструкцию.

Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и секвенировали для подтверждения идентичности исходному гену.

На следующем этапе работы проверяли экспрессию клонированного гена *aph(3'')-Id* в штаммах *E. coli*. С целью подбора экспрессионного штамма полученной плазмидой pET16b: *aph(3'')-Id* трансформировали штаммы *E. coli*: BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) CodonPlus, B834(DE3), NiCo21(DE3). Экспрессию анализировали с помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рисунок 27).

Полученные результаты показали, что в клетках штаммов *E. coli* BL21(DE3) и BL21(DE3)pLysS наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 30 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка Aph(3'')-Id в сумме с молекулярной массой белка линкера плазмиды pET16b, содержащего His-Tag. Максимальная экспрессия гена *aph(3'')-Id* была установлена в штамме *E. coli* BL21(DE3). В штамме BL21(DE3)-CodonPlus наблюдалась очень слабая экспрессия, в штаммах NiCo21(DE3) и B834(DE3) ген *aph(3'')-Id* не экспрессировался.

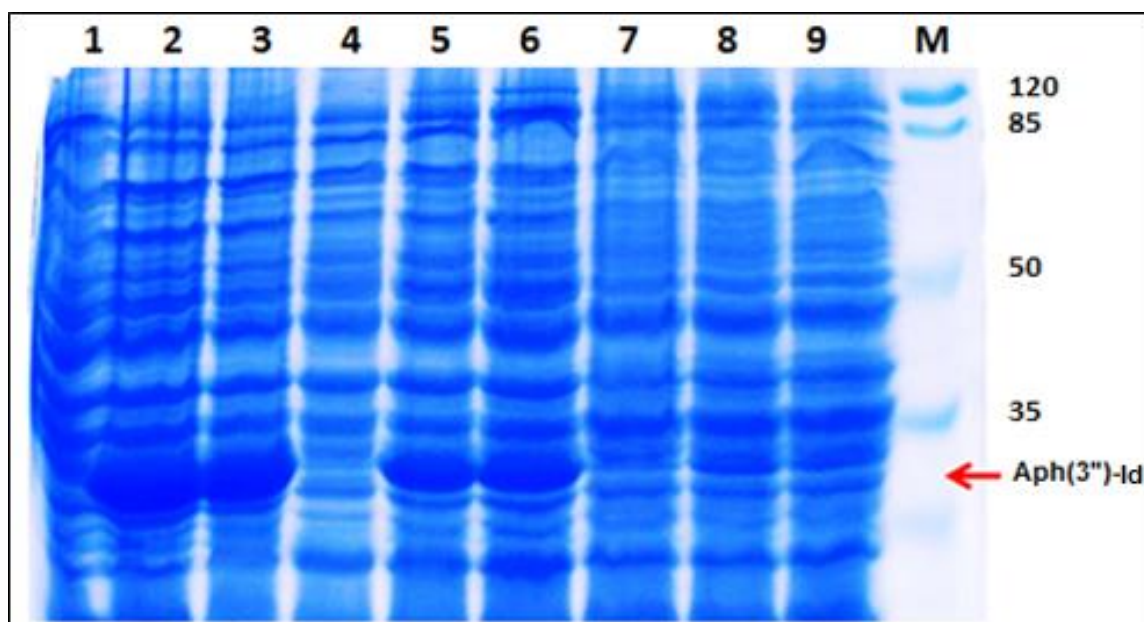


Рисунок 27. Электрофорез растворимой фракции белков штаммов *E. coli*:

1-3 – штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиды: 1 - pET16b, 2, 3 - pET16b:*aph(3'')-Id*;
 4-6 – штамм *E. coli* BL21(DE3) pLysS, содержащий плазмиды: 4 - pET16b,
 5, 6 - pET16b:*aph(3'')-Id*;
 7-9 – штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus, содержащий плазмиды: 7 - pET16b,
 8, 9 - pET16b:*aph(3'')-Id*, M – маркер молекулярного веса белков SM0441 (Fermenas, Литва).

Таким образом, исследуемый ген имеет различный уровень экспрессии в штаммах *E. coli*, для проведения дальнейших работ выбран штамм *E. coli* BL21(DE3).

3.3.3. Исследование спектра и уровня устойчивости клеток *Escherichia coli*, содержащих ген *aph(3'')-Id*, к аминогликозидным антибиотикам

Проверена устойчивость штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего гены *aph(3'')-Id* и *aph(3')-VIII*, к различным аминогликозидным антибиотикам двумя методами: стандартных дисков и линейных разведений.

Ранее было установлено, что ген *aphVIII* обуславливает устойчивость *E. coli* BL21(DE3) к канамицину и неомицину [Sizova et al., 2002]. Проведенные исследования по определению зоны подавления роста штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего рекомбинантную плазмиду pET16b:*aph(3'')-Id*, вокруг бумажных дисков показали, что ген *aph(3'')-Id* обуславливает устойчивость *E. coli* BL21(DE3) к стрептомицину (таблица 14, рисунок 28).

Таблица 14. Исследование устойчивости штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего ген *aph(3'')-Id*, к аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков.

Антибиотики		Штаммы <i>E. coli</i>		
		BL21(DE3) pET16b	BL21(DE3) pET16b: <i>aphVIII</i>	BL21 (DE3) pET16b: <i>aph(3'')-Id</i>
Название	Концентрация, мкг/диск	Диаметр зоны подавления роста, мм		
Канамицин	30	17±0.6	10.0±0.4	16±0.5
Неомицин	30	17±0.5	8.0±0.4	16±0.5
Амикацин	30	17±0.5	19.0±0.5	18±0.5
Стрептомицин	10	16±0.5	15.5±0.5	8.0±0.4
Гентамицин	10	21±0.5	20.5±0.5	20±0.6
Тобрамицин	10	18±0.5	20.0±0.5	19±0.6
Сизомицин	10	19±0.5	18.5±0.4	19±0.6
Нетилмицин	10	20±0.5	21.0±0.6	19±0.5
Изепамицин	30	18±0.5	20.0±0.6	18±0.5
Спектиномицин	100	10±0.4	9±0.3	9±0.4
Паромомицин	30	8±0.4	9±0.4	9±0.4
Гигромицин	30	10±0.4	10±0.4	10±0.4

*В таблице приведены усредненные результаты пяти независимых измерений, достоверность различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05 (программа Statistica v6).

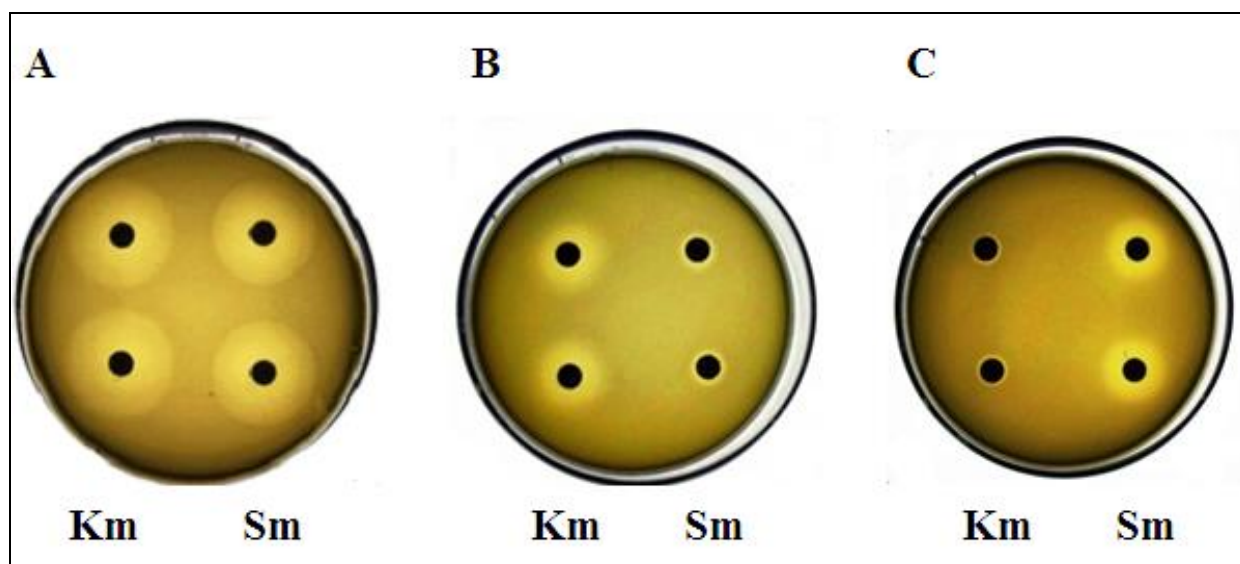


Рисунок 28. Исследование устойчивости штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего, *aph* гены, к канамицину и стрептомицину: А - плазмида pET16b; В – плазмида pET16b:*aph(3'')-Id*; С – плазмида pET16b:*aphVIII*.

Тестирование уровня устойчивости к стрептомицину методом реплик показало, что штамм *E. coli* BL21(DE3) pET16b:*aph(3'')-Id* устойчив к стрептомицину в концентрации 150 мкг/мл.

Таким образом, в отличие от *aph(3')-VIII* (обуславливающего устойчивость клеток бактерий к канамицину в концентрации до 350 мкг/мл), ген *aph(3'')-Id* придает клеткам *E. coli* устойчивость к стрептомицину (в концентрации до 150 мкг/мл). Полученные данные согласуются с проведенным филогенетическим анализом, согласно которому данный ген отнесен к подсемейству Aph(3'').

Далее проводили определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) стрептомицина для аминогликозидфосфотрансферазы *aph(3'')-Id* в штамме *E. coli* BL21(DE3) методом серийных разведений. В качестве контролей использовали как исходный штамм *E. coli* BL21(DE3), так и штамм *E. coli* BL21(DE3) с плазмидным вектором pET16b (таблица 15).

Таблица 15. Сравнение устойчивости штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащего генетическую конструкцию pET16b: *aph(3'')-Id* и контрольных проб методом анализа МИК.

№	Конц-я St, µg/ml	Оптическая плотность				
		BL21(DE3)	pET16b		pET16b: <i>aph(3'')-Id</i>	
		OD600	OD600	cell/ml	OD600	cell/ml
1	0.88	1.640	1.644	8.22*e	1.868	9,34*e
2	1.75	1.502	1.500	7.50*e	1.865	9.32*e
3	2.5	1.473	1.471	7.35*e	1.860	9.30*e
4	5	1.096	1.098	5.49*e	1.759	8.80*e
5	10	1.010	1.012	5.06*e	1.736	8.68*e
6	20	0.077	0.087	0.43*e	1.720	8.66*e
7	40	0	0	0	1.668	8.34*e
8	80	0	0	0	1.607	8.03*e
9	160	0	0	0	1.327	6.63*e
10	320	0	0	0	1.002	5.01*e
11	640	0	0	0	0	0

*Примечание. Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений.

В ходе проведения экспериментальной работы было установлено, что в условиях экспрессии *aph(3'')-Id* в штамме *E. coli* BL21(DE3) минимальная ингибирующая концентрация стрептомицина, подавляющая рост клеток *E. coli*, увеличивается в 14 раз.

Суммарные данные по устойчивости штамма *E. coli* BL21(DE3):*aph(3'')*-*Id* к стрептомицину представлены в таблице 16.

Таблица 16. Сравнение устойчивости к стрептомицину штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащих генетическую конструкцию pET16b:*aph(3'')*-*Id* и контрольных проб.

Штамм <i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	BL21(DE3) pET16b	BL21(DE3) pET16b: <i>aph(3'')</i> - <i>Id</i>
Диаметр зоны подавления роста вокруг бумажного диска с антибиотиком, мм		
16±0.5	15.5±0.5	8±0.4
Минимальная ингибирующая концентрация стрептомицина, мкг/мл		
25	25	350

*Примечание. Приведены усредненные результаты трех независимых измерений ± стандартные отклонения.

На основании результатов спектра и уровня устойчивости в *E. coli* для последующей кристаллизации был отобран белок Aph(3'')-Id. По данным PDB для белков подсемейства Aph(3'') еще не получены 3D структуры.

3.3.4. Отработка условий выделения белка Aph(3'')-Id, получение рекомбинантного белка в количествах, необходимых для последующих структурно-функциональных исследований

Для отработки условий выделения рекомбинантного белка Aph(3'')-Id проводили выращивание штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET16b:*aph(3'')*-*Id*, в 250 мл жидкой среды LB с индукцией ИПТГ, затем биомассу осаждали центрифугированием и замораживали при –20°C. Из полученной биомассы проводили выделение и очистку рекомбинантного белка Aph(3'')-Id методом металлоаффинной хроматографии на Ni-связывающих Ni-NTA колонках (Qiagen, США) в нативных условиях.

Для проверки возможности выделения белка в нативных условиях биомассу размораживали при 4°C, ресуспендировали в нативном лизирующем буфере с добавлением лизоцима (1 мг/мл) и 20 мМ 2-меркаптоэтанола и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. Затем суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции в течение 4 мин, не допуская нагревания раствора, и центрифугировали для разделения на растворимую фракцию (лизат) и осадок (тельца включения). Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле.

Анализ выделенных фракций показал, что целевой белок находится в растворимой форме (лизате), что дает возможность выделения белка в нативных условиях. Лизат наносили на Ni-NTA-колонку, предварительно уравновешенную лизирующим буфером, колонку трижды промывали промывочным буфером. Связавшийся белок дважды элюировали с колонок буфером, содержащим 300 мМ имидазол. На рисунке 29 представлена электрофореграмма этапов выделения и очистки белка Aph(3'')-Id.

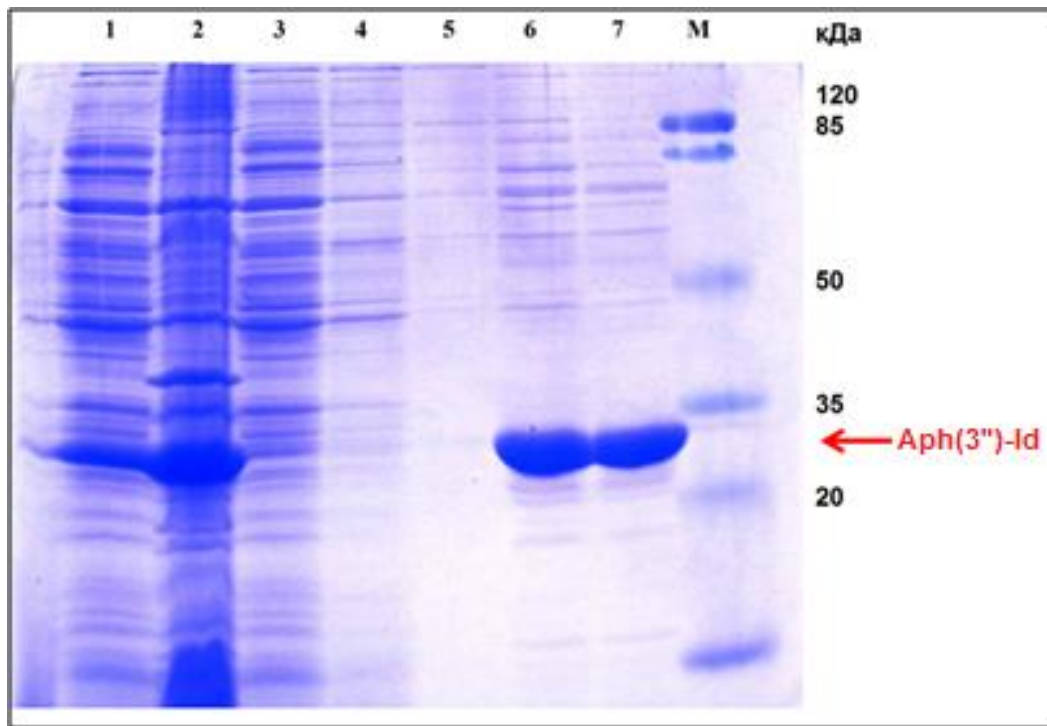


Рисунок 29. Электрофореграмма этапов очистки белка Aph(3'')-Id из штамма *E.coli* BL21(DE3) pET16b: *aph(3'')-Id*:

1 – растворимая цитоплазматическая фракция; 2 – нерастворимая клеточная фракция; 3 – пропуск через колонку; 4 – отмывка 1; 5 – отмывка 2; 6 – элюат 1; 7 – элюат 2; М – маркер молекулярного веса белков SM0441 (BioRad, США).

Концентрация выделенного и очищенного белка Aph(3'')-Id (проба 7) была измерена на флуориметре и составила 0.81 (± 0.05) мг/мл. Таким образом, установлено, что белок Aph(3'')-Id хорошо выделяется в нативных условиях. Чистота полученного белка подтверждена данными электрофореза в 12% полиакриамидном геле. Выделенный белок был идентифицирован методом масс-спектрометрии.

На следующем этапе работы было проведено выделение белка Aph(3'')-Id в количествах, достаточных для дальнейшего изучения, с использованием ферментера LiFlus GX объемом 5 литров (Biotronix, Корея).

3.3.5. Анализ фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro*

Для анализа фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro* использовали два разных метода:

- 1) метод тонкослойной хроматографии с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ для идентификации ^{32}P -меченного стрептомицинофосфата;
- 2) метод с использованием люминесцентной реакции, основанный на определении фосфотрансферазной активности по количеству АТФ, оставшегося в ходе реакции.

В ходе хроматографического анализа было установлено, что стрептомицин активно фосфорилируется ферментом Aph(3'')-Id. Количество $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$, включенного в стрептомицин, прямо пропорционально количеству добавляемого стрептомицина (рис. 30). В отсутствие стрептомицина и в присутствии канамицина (отрицательные контроли) активность фермента не наблюдалась.

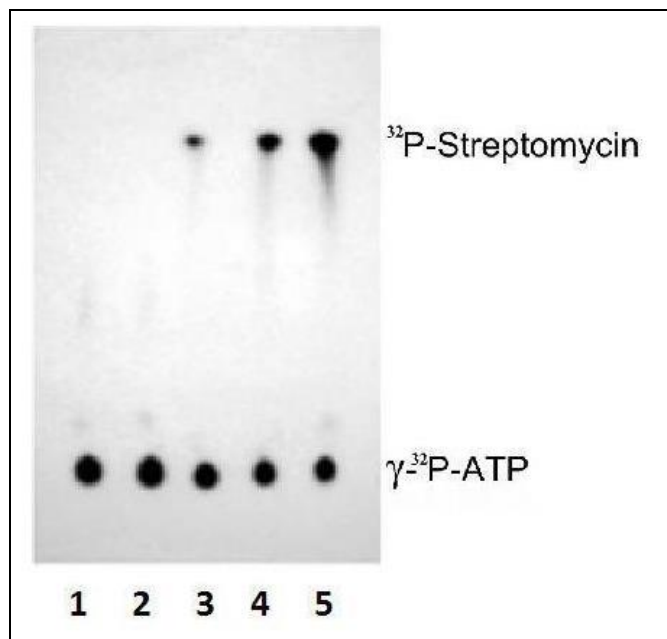


Рисунок 30. Авторадиограмма результатов тонкослойной хроматографии.

1 – контроль без антибиотиков (АТФ и белок); 2 – реакция в присутствии канамицина, 1200 мкг/мл; реакция в присутствии стрептомицина – 400 мкг/мл (3), 800 мкг/мл (4), 1200 мкг/мл (5).

В ходе проведения люминесцентной реакции было установлено, что стрептомицин активно фосфорилируется ферментом Aph(3'')-Id, количество АТФ, включенного в стрептомицин, пропорционально количеству добавляемого стрептомицина (таблица 17; рисунок 31).

Таблица 17. Фосфорилирование стрептомицина аминогликозидфосфотрансферазой Aph(3'')-Id.

Количество стрептомицина в реакционной смеси, мкг	Количество АТФ, оставшегося после киназной реакции, %	Фосфорилирование стрептомицина, %
0.3	95 ± 5	5 ± 5
0.6	86 ± 5	14 ± 5
1	77 ± 4	23 ± 4
2	52 ± 3	48 ± 3
3	25 ± 2	75 ± 2

*Приведены усредненные результаты 4 независимых измерений ± стандартные отклонения.

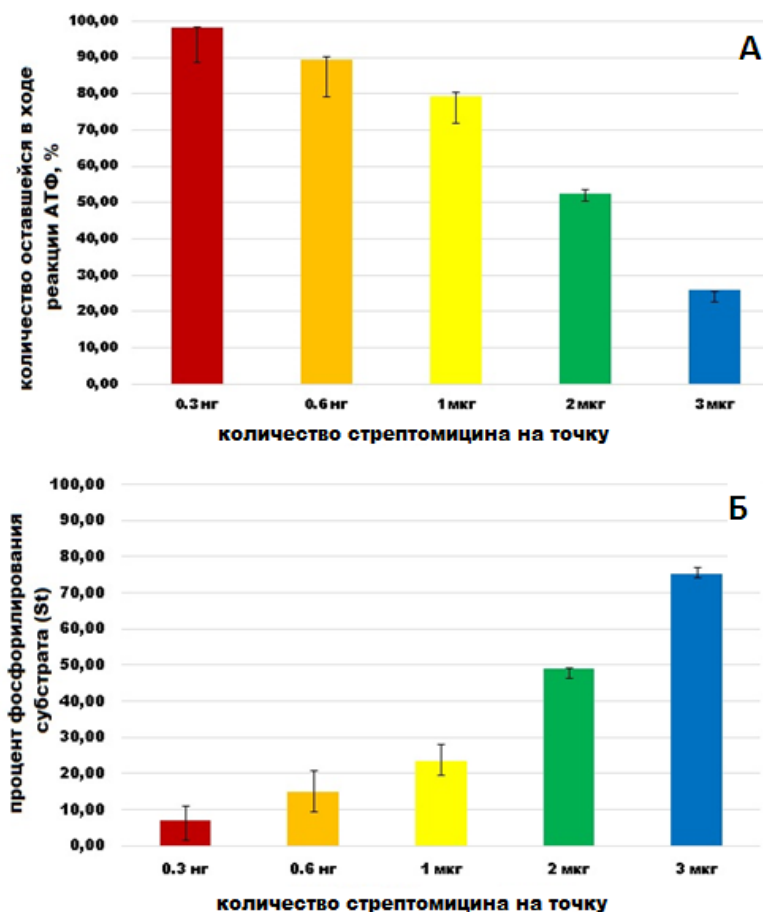


Рисунок 31. Проверка активности фермента Aph(3'')-Id по фосфорилированию стрептомицина с помощью люминесцентной реакции: А – зависимость процента оставшейся в ходе реакции АТФ от количества стрептомицина в пробе; Б – зависимость процента фосфорилирования от количества стрептомицина.

Количество белка во всех пробах составляло 20 нг. В отсутствии стрептомицина и в присутствии канамицина (отрицательные контроли) активность фермента также не

наблюдалась. В целом, полученные данные указывают на то, что выделенный белок, Aph(3'')-Id, является ферментативно активным и способным к фосфорилированию субстрата – аминокликозидного антибиотика стрептомицина.

3.3.6. Исследование автофосфорилирования рекомбинантного белка Aph(3'')-Id *in vitro*

Ранее было установлено, что ферменты семейства аминокликозидфосфотрансфераз по структуре и функциям имеют определенное сходство с серин-треониновыми протеинкиназами эукариот [Shakia et al., 2011]. Первым этапом функционирования многих бактериальных СТПК протеинкиназ в клетке является их способность к фосфорилированию или автофосфорилированию, которая превращает эти ферменты в активное состояние [Sceef et al., 2005]. Для белков аминокликозидфосфотрансфераз ранее не была показана способность к автофосфорилированию.

Исследование способности рекомбинантного белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию *in vitro* проводили с использованием двух методов:

- 1) инкубацией с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
- 2) с использованием люминесцентной реакции, величину автофосфорилирования определяли, измеряя количество АТФ, оставшегося в ходе реакции.

Белок инкубировали с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ в буферном растворе, затем проводили электрофорез меченых белков в SDS-ПААГ (рисунок 32А). Для регистрации меченых белков полученный SDS-ПААГ экспонировали с рентгеновской пленкой KODAK MXG Film (100sh), рисунок 32Б. В присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ белок включает в свой состав меченый фосфат.

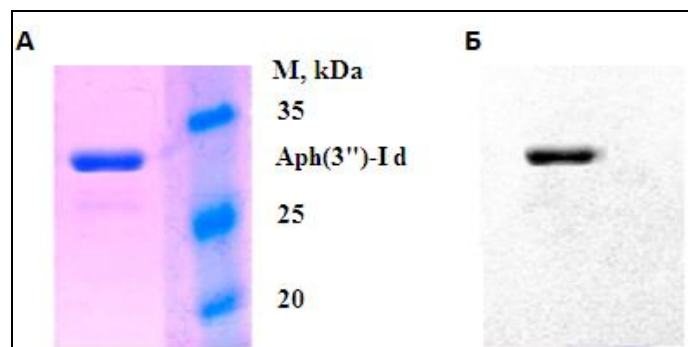


Рисунок 32. Проверка способности белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$:

А - электрофореграмма белка Aph(3'')-Id;

Б - автордиограмма автофосфорилирования белка Aph(3'')-Id.

Исследование автофосфорилирования белка Aph(3'')-Id проводили также с помощью люминесцентной реакции по количеству АТФ, оставшейся в ходе реакции при помощи набора Kinase-Glo⁺ Plus Luminiscent Kinase Assay (Promega, США), информация отображена в таблице 18 и на рисунке 33.

Таблица 18. Исследование автофосфорилирования белка Aph(3'')-Id с использованием люминесцентной реакции.

Количество белка в реакционной смеси, мкг	Количество АТФ, оставшегося после киназной реакции, %	Автофосфорилирование Aph(3'')-Id, %
5	81.3 ± 4.49	19.7 ± 4.49
25	34.5 ± 0.34	65.5 ± 0.34
50	10.7 ± 1.07	89.3 ± 1.07
75	6.8 ± 0.55	93.2 ± 0.55

* Примечание. Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений ± стандартные отклонения.

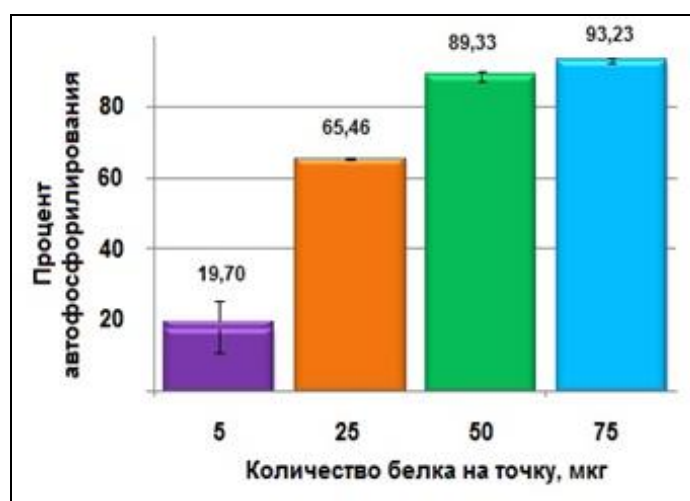


Рисунок 33. Способность белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию, выраженная в процентах.

Полученные двумя методами результаты указывают на то, что выделенный белок Aph(3'')-Id обладает способностью к автофосфорилированию. Таким образом, в настоящей работе впервые была исследована и показана способность аминокликозидфосфотрансферазы Aph(3'')-Id штамма *S. rimosus* ATCC 10970 к автофосфорилированию.

3.3.7. Нарботка биомассы штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмидой pET16b: *aph(3'')-Id* в ферментере для последующей кристаллизации белка Aph(3'')-Id

На следующем этапе работы проводили наработку биомассы *E. coli*, содержащую ген *aph(3'')-Id*, с целью получения 3D структуры данного фермента (структура получена в рамках гранта РФФИ № 17-04-01106 коллегами из института биохимии им. А.Н.Баха и НИЦ Курчатковского института – К.М. Бойко, А.Ю. Николаевой и Д.А. Корженевским и представлена на рисунке 34).

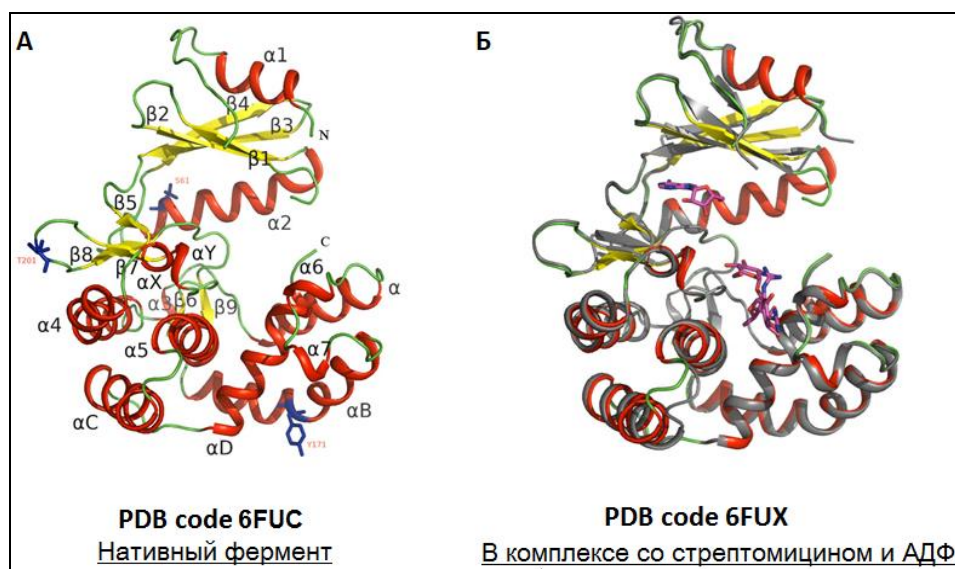


Рисунок 34. Трехмерные структуры белка Aph(3'')-Id:

А – 3D структура Aph(3'')-Id, апо-форма; Б – 3D структура Aph(3'')-Id в комплексе с аминогликозидным антибиотиком стрептомицином.

Структура Aph(3'')-Id была получена с использованием метода молекулярного замещения с помощью программы MOLREP и состоит из одного мономера из 268 аминокислотных остатков. Установлено, что при формировании комплекса со стрептомицином и АДФ происходит изменение конформации структуры в области 24-29 аминокислотных остатков.

Получены трехмерные структуры Aph(3'')-Id в нативной форме и в комплексе со стрептомицином и АДФ с разрешением 1.17 Å и 1.65 Å, соответственно. Структура комплекса Aph(3'')-Id со стрептомицином и АДФ получена впервые для этого класса ферментов. Сравнительный анализ этих двух 3D структур и их сравнение с ранее известными структурами аминогликозидфосфотрансфераз выявил, что основные различия связаны со структурой субстрат-связывающего кармана, ответственного за специфичность для конкретного типа антибиотика. Сравнение апо-формы Aph(3'')-Id и комплекса с субстратами показало, что, как и

в случае других Aph, связывание субстрата не вызывает перемещения домена (расстояние между эквивалентными атомами C α составляет менее 0.6 Å). Единственным отличием в структуре фермента, происходящим при формировании комплекса со стрептомицином, является ориентация петли между $\alpha 5$ и αC на поверхности белка. Обе структуры имеют неупорядоченную петлю между $\alpha 1$ и $\beta 2$ областями, невидимую в картах электронной плотности. Сравнение данных структур со структурами ранее изученных Aph продемонстрировало, что трехмерная структура Aph(3'')-Id аналогична структуре других ферментов семейства Aph. Тем не менее, существуют некоторые различия между анализируемыми трехмерными структурами. Наиболее существенные различия наблюдаются в N-концевой доле. Спираль $\alpha 1$ аминогликозидфосфотрансферазы Aph(3'')-Id значительно длиннее по сравнению с этой спиралью у большинства Aph(3'). Только спираль $\alpha 1$ APH (3') - VIII аналогична по длине спирали Aph (3'')-Id. У Aph(3'')-Id эта спираль в большей степени ориентирована на β -регион N-концевого домена. Кроме того, каноническая цепь $\beta 1$ у Aph(3'')-Id отсутствует. Наконеч, петля между $\beta 2$ и $\beta 3$ в Aph(3'') - Id значительно короче, чем у других ферментов семейства Aph. С-концевая доля Aph(3'')-Id также имеет некоторые уникальные особенности. Во-первых, существует небольшая уникальная цепь βX в Aph (3'') - Id, которая участвует в формировании β -региона вместе с $\beta 7$ и $\beta 8$. Области $\beta 7$ и $\beta 8$ по длине похожи на таковые у APH(3')-VIII и примерно в два раза короче, чем в других Aph(3'). Две небольшие спирали, αX и αY , наблюдаемые в структуре Aph(3'')-Id, присутствуют в некоторых APH, но рассматриваемая Aph(3'')-Id является первым примером их одновременного присутствия в молекуле фермента такого типа. Спираль αC у Aph (3'')-Id длиннее по сравнению с другими Aph, что приводит к различной конформации петли между этой спиралью и $\alpha 5$. Спираль αB примерно в два раза длиннее соответствующей спирали в других Aph, она выступает почти до $\beta 6$ и имеет изгиб в центральной части. Наконеч, Aph(3'')-Id имеет две дополнительные крошечные спирали ($\alpha 6$ и $\alpha 7$), которые отсутствуют у других Aph.

В нуклеотид-связывающей области фермента Aph(3'')-Id в связывании субстрата участвуют аминокислотные остатки 22-30. В области фермента, ответственной за связывание с аминогликозидным антибиотиком, также имеются отличия от других Aph-ферментов. Они обусловлены структурными различиями между молекулой стрептомицина и другими аминогликозидными антибиотиками и приводят к тому, что остатки, участвующие в связывании аминогликозидов в структуре Aph(3'')-Id, существенно отличаются от таковых у других Aph. Так, в связывании со стрептомицином у Aph(3'')-Id участвуют аминокислотные остатки Phe151, Pro153, Leu264, Pro268 и Trp271, уникальные для Aph(3'') и полуконсервативный аминокислотный остаток Leu224 (рисунок 35).

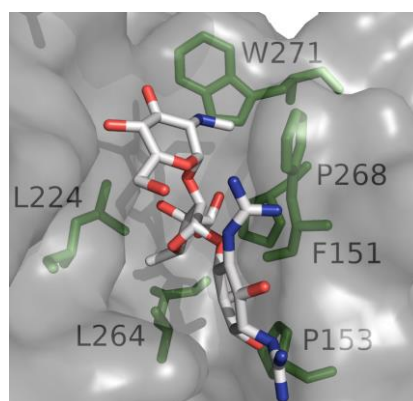


Рисунок 35. Взаимодействие с молекулой стрептомицина в структуре комплекса Aph(3'')-Id [Alekseeva et al., 2019]. Молекула стрептомицина отображена белым цветом, аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с антибиотиком, выделены зеленым цветом.

Таким образом, при помощи биоинформационного и сравнительного филогенетического анализа в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 был идентифицирован новый ген *aph(3'')-Id*, кодирующий стрептомицинофосфотрансферазу. Ген *aph(3'')-Id* клонировали в *E. coli*, индукция экспрессии рекомбинантного белка увеличивала минимальную ингибирующую концентрацию стрептомицина до 350 мкг/мл.

3.4 Аминогликозидфосфотрансфераза AphSR2: зависимость устойчивости к антибиотикам от серин-треониновых протеинкиназ

3.4.1. Биоинформатический анализ гена *aphSR2*

Объектом дальнейшим исследований являлась AphSR2. С использованием баз данных NCBI и UniProt установлено, что ген *aphSR2* расположен в одном кластере с генами двух серин-треониновых протеинкиназ, которым нами были присвоены следующие названия (по номерам локусов генов): SRIM_07563 – *pkSR1*, SRIM_07568 – *pkSR2*. Транскрипция гена *pkSR1* происходит в том же направлении, как и гена *aphSR2*, рисунок 36.

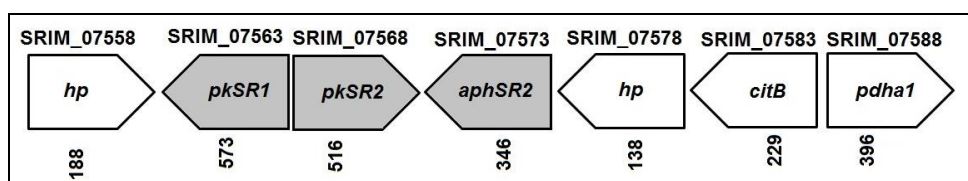


Рисунок 36. Транскрипционная организация кластера генов *aphSR2* и *pkSR1*, *pkSR2* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 (*hp* – hypothetical protein, *citB* – putative two-component system response transcriptional regulator, *pdha1* – pyruvate dehydrogenase E1)

Белок состоит из 346 аминокислотных остатков. Молекулярная масса составляет 38.147 кДа, изоэлектрическая точка $pI=9.09$. Доменная структура белка представлена каталитическим доменом, АТФ-связывающим доменом и субстратсвязывающим карманом. С помощью программы NetPhos 3.1 определены потенциальные сайты фосфорилирования по остаткам серина, треонина и тирозина (с вероятностью более 90% – S₅, S₁₇₈, S₁₈₂, S₁₈₃, S₂₈₃).

На основании проведенного биоинформатического анализа был составлен паспорт гена *aphSR2* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и кодируемого им белка (Приложение 2).

Сравнительный анализ AphSR2 с известными 3D структурами программой SAS показал сходство AphSR2 с 3D структурой трансферазы Rv3168 (PDB ID - 3ATS) штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (идентичность 31,2%). Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей программой Clustal Omega продемонстрировал, что последовательность AphSR2 имеет значительно больше общих консервативных аминокислотных остатков с последовательностью Rv3168, чем с аминогликозид-фосфотрансферазой Aph(7'')-Ia (рис. 37).

AphSR2	MLR-----SSDVRTAAPPDGHTLGSLLRRY-----GAGEPLSCVPVAEGLLNHGYRLATTH 51	
APH (7'') -Ia	-----MTQ 3	
Rv3168	MANEPAIGAIIDRLQRSSRDVTTLPAVISRWLSSVLPFGGAPEVTVESGVDSTGMSSET-- 58	
AphSR2	GRYFLKHHLDGQAAI-----ARQHRATFRRLGALGLPVAPPLADADG----- 93	
APH (7'') -Ia	ESLLLLDRIDSDDSYASLRNDQEFWEPLARRALEELGLPVPPVLRVPGESTNPFVLVGEFD 63	
Rv3168	--IILTARWQDDGRSI-----QQKLVARVAPAAEDVPVFPPTYRLDHFQFEVIRLVGEL- 108	
	: * : : * : : * : : * * : : * * *	
AphSR2	-----RTVTVLGG-----RCYALHPWVE 111	
APH (7'') -Ia	PVIKLFGEHWCGPESLASESEAYAVLADAPVVPVPRLLGRGELRPGTGAWPWPYLVMS--- 120	
Rv3168	-----TDVVPVRVRIETTGDVLCI-----PFELMDYVE 137	
	: : *	
AphSR2	GRHRDGA-----ALTRHQSRCLGALLGQVHTALEQVITPDTAGPGVPEHAGA 159	
APH (7'') -Ia	-----RMTGTTWRSAMDGTTDRNALALALARELGRVLRGRVLRVPLTGNTVLTTPHSEV 171	
Rv3168	GVVPPDVMPYTFGDNWFADAPAERQRQLQDATV-----AALATLHSIPNAQNTFSFLTQGR 193	
	: . * : * : : .	
AphSR2	D---PAR---TFEMIDELLALARRSRPSSFDELAEHRLLEERRALLEREARRRPGADRV 212	
APH (7'') -Ia	FPPELLRERAAATVEDHRGW-----GYLSPRLDRLEDWLPDVDL-LLAGRE 216	
Rv3168	TSDTTLHR---HENWVRSWYDFA-----VEGIGRSPLLERTFEWQLQSHWPDDAAARE 242	
	* : : * * * * *	
AphSR2	BATGWVHGDFHPLNLLYRDA--EPAAIVDWDRLAVQPRAEAEAVRAA--AIFEVQPA-GTL 267	
APH (7'') -Ia	PR--FVHGDLHGTFVVDLAATEVTGIVDFDTDYAGDSRYSLSVQLHLN--AFRGDREILA 272	
Rv3168	PV--LLWGDARVGNVLYRDF--QPVAVLDWEMVALGPRELDVAWMIFAHRVHQELA-GLA 297	
	* : * * : * : : : : * : : *	
AphSR2	DLPKVGAY-----AGAYRRASGAGAAEELAAAVHRVWVERL-NDFWMLDWRYRLGDRRAD 320	
APH (7'') -Ia	ALLDGAQWKRTEDFA-----RELLAFTFLHDFEVFE-----ETPLD 308	
Rv3168	TLPLGLPEVMREDDVRATYQALTGVELGDL-----HWFYVYSGVMWACVE-MRTGARRVH 350	
	* : *	
AphSR2	P---QFPAAAALAVVWWTREYGAVRAAFTE-- 346	
APH (7'') -Ia	LSGFDPPEELAQFLWGPDPDAP----GA-- 332	
Rv3168	FGEIEKFPDDV-ESLHYH--AGLMKHLGEEH 378	
	* : :	

Рисунок 37. Сравнение аминокислотной последовательности AphSR2 с последовательностями Aph(7'')-Ia и Rv3168 (консервативные остатки между тремя последовательностями выделены черным цветом, между двумя – серым).

3.4.2. Совместное клонирование генов *aphSR2* и протеинкиназ *pkSR1*, *pkSR2* и изучение их экспрессии

При проведении биоинформатического анализа с использованием баз данных NCBI и UniProt было установлено, что ген *aphSR2* расположен в одном кластере с генами двух серин-треониновых протеинкиназ (СТПК), которым нами были присвоены следующие названия (по номерам локусов генов): SRIM_07563 – *pkSR1*, SRIM_07568 – *pkSR2*.

В рамках дальнейшей экспериментальной работы изучалось влияние генов СТПК *pkSR1* и *pkSR2* на устойчивость *E. coli* BL21(DE3), содержащих ген *aphSR2*, к аминогликозидным антибиотикам, в связи с чем проводили совместное клонирование данных генов в составе экспрессионного вектора pET32a.

Клонирование гена *aphSR2* в *E. coli* (локус гена SRIM_07573), было проведено по схеме, представленной на рисунке 38. Изоляцию гена *aphSR2* осуществляли с геномной ДНК штамма *S. rimosus* методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов Aph_07573-fr и Aph_07573-rev. При клонировании гена *aphSR2* в клетках *E. coli* BL21(DE3) наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 39 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка AphSR2 в сумме с молекулярной массой белка линкера плазмиды pET16b, содержащего His-Tag.

Далее проводили клонирование каталитических доменов протеинкиназ в штаммы *E. coli*. Амплификацию генов *pkSR1* и *pkSR2* осуществляли с геномной ДНК *S. rimosus* методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов: PkSR1-fv и PkSR1-rev для гена *pkSR1*, PkSR2-fv и PkSR2-rev для гена *pkSR2*. Полученные фрагменты клонировали по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII в экспрессионный вектор pET28a.

Полученные плазмиды обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XbaI и XhoI и встраивали по указанным сайтам рестрикции в экспрессионный вектор pET32a. В результате клонирования получены гибридные плазмиды: pET32aM:*pkSR1*, pET32aM:*pkSR2*.

Затем проводили клонирование гена *aphSR2* в плазмиды pET32aM:*pkSR1* и pET32aM:*pkSR2* по сайту эндонуклеазы рестрикции XbaI. Для контроля было проведено клонирование гена *aphSR2* в плазмиду pET32a по сайту эндонуклеазы рестрикции XbaI. Скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов T7prom и AphC-XbaI, что позволяло отбирать клоны с требуемой ориентацией.

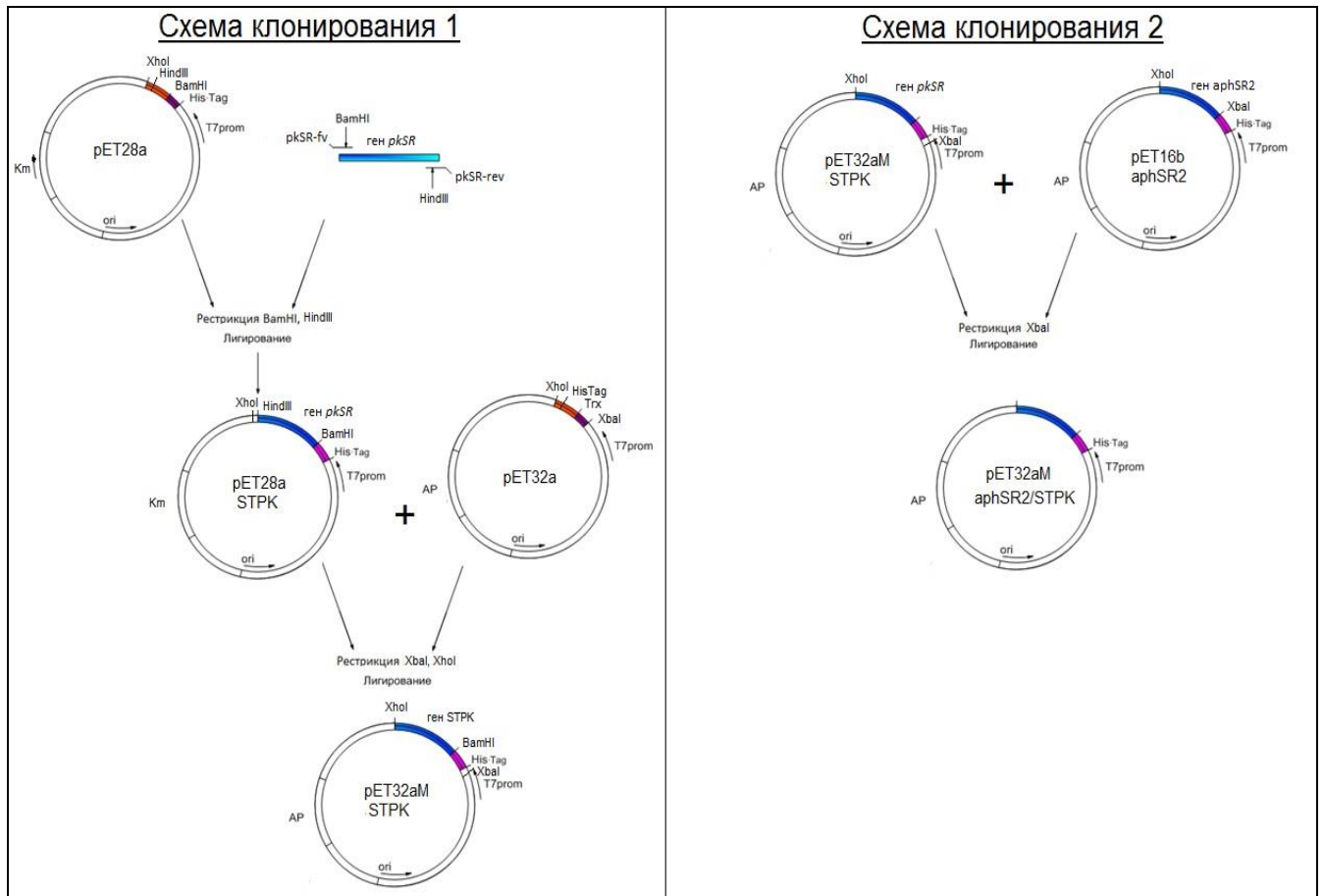


Рисунок 38. Схема двухэтапного совместного клонирования генов *aphSR2*, *pkSR1* и *pkSR2* в *E. coli* BL21(DE3) в составе экспрессионных векторов pET28a, pET32a.

Для изучения экспрессии генов *aphSR2*, *pkSR1* и *pkSR2* полученными гибридными плазмидами трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) и выращивали в жидкой среде. Анализ экспрессии генов проводили по наличию экспрессии их белковых продуктов с помощью SDS-электрофореза в 12.5% ПААГ по методу Лэммли.

В качестве контроля использовали фракции белков штаммов *E. coli*, содержащих плазмиду pET32a без вставки.

Анализ электрофореграммы показал дополнительные фракции белков с молекулярными массами 33, 32 и 41 кДа, что соответствует расчетным молекулярным массам белков каталитических доменов протеинкиназ PkSR1 и PkSR2 и массе белка AphSR2, рисунок 39.

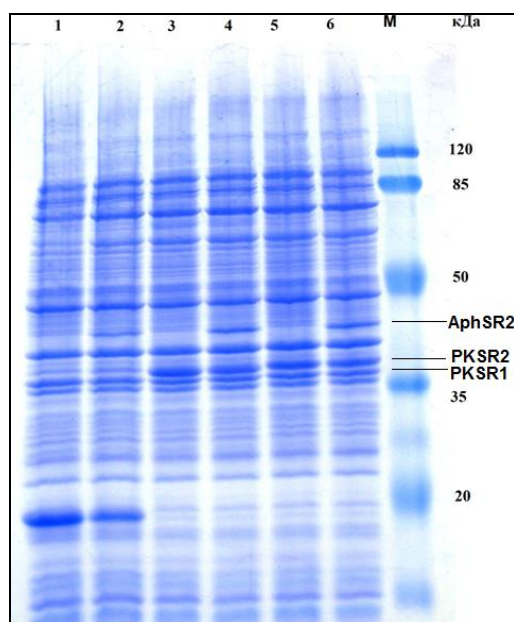


Рисунок 39. Электрофорез растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиды: 1 – pET32a, 2 – pET32a:*aphSR2*; 3 – pET32a:*pkSR1*, 4 – pET32a:*aphSR2*+*pkSR1*, 5 – pET132a:*pkSR2*, 6 – pET32a:*aphSR2*+*pkSR2*; M – маркер молекулярной массы белков SM0441 (Fermentas, Литва).

3.4.3. Исследование спектра и уровня устойчивости клеток *Escherichia coli*, содержащих гены *aphSR2*, *pkSR1* и *pkSR2* к аминогликозидным антибиотикам

Определяли спектр устойчивости к аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащих все полученные рекомбинантные плазмиды (таблица 19).

Таблица 19. Изменение уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам при совместной экспрессии в *E. coli* BL21(DE3) генов *aphSR2*, *pkSR1* и *pkSR2*.

Проверяемый антибиотик	Исследуемые конструкции						
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> pET32a	<i>E. coli</i> pET32a: <i>aphSR2</i>	<i>E. coli</i> pET32a: <i>aphSR2</i> + <i>pkSR1</i>	<i>E. coli</i> pET32a: <i>pkSR1</i>	<i>E. coli</i> pET32a: <i>aphSR2</i> + <i>pkSR2</i>	<i>E. coli</i> pET32a: <i>pkSR2</i>
Неомицин (30 мкг/диск)	19±0,6	19±0,5	16±0,6	12,5±0,7	19±0,6	16±0,5	19±0,6
Канамицин (30 мкг/диск)	21±0,5	21±0,6	21±0,8	21±0,6	21±0,5	21±0,6	21±0,7
Гигромицин (100 мкг/диск)	15±0,5	15±0,6	12±0,5	14±0,4	17±0,6	16,5±0,6	18±0,5

В таблице приведены усредненные результаты трех независимых измерений, данные представлены в виде: среднее значение $\pm\sigma$ (сигма, среднее отклонение). Достоверность различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента. Уровень значимости отличий между выборками составлял 0.05 (программа Statistica v6).

Проведенные исследования показали, что ген *aphSR2* обуславливает устойчивость *E. coli* BL21(DE3) к неомицину и гигромицину. В случае совмещения генов *aphSR2* и *pkSR1* в одном векторе уровень устойчивости *E. coli* к неомицину увеличивался, а в случае совмещения генов *aphSR2* и *pkSR2* не изменялся.

Совмещение генов *aphSR2* и СТПК (*pkSR1* или *pkSR2*) не оказывало влияния на устойчивость к гигромицину.

В качестве контроля были проведены исследования по влиянию генов СТПК на устойчивость *E. coli* BL21(DE3), данные гены не оказывали влияния на устойчивость к неомицину, но повышали чувствительность к гигромицину. Данное явление не изучалось подробнее в рамках данной работы. Один из возможных механизмов – фосфорилирование данными киназами белков, влияющих на устойчивость к гигромицину.

Эти результаты позволяют предположить, что ген *aphSR2* может быть кандидатом устойчивости к гигромицину у *S. rimosus*. Согласно литературным данным, *aph(7'')-Ia* обуславливает устойчивость к гигромицину В [Berthold et al., 2002], а *rv3168* – к канамицину [Kim et al., 2011]. В отличие от генов *rv3168* и *aph(7'')-Ia*, *aphSR2* показал влияние на устойчивость клеток *E. coli* к неомицину и гигромицину. Гигромицин В (HugB) является одним из аминогликозидных антибиотиков и широко используется в экспериментах по молекулярной биологии. Известно, что две киназы инактивируют HugB посредством фосфорилирования: APH(7'')-Ia из *Streptomyces hygroscopicus* и APH(4)-Ia из *E. coli*. Они фосфорилируют гидроксильные группы в положениях 7'' и 4, соответственно. Механизмы взаимодействия этих двух ферментов с гигромицином В на данный момент активно изучаются, получено несколько трехмерных структур: APH(4)-Ia в комплексе с HugB и аналогом АТФ – 5'-аденилил- β,γ -имидодифосфатом (PDB ID 3W0R), APH(7'')-Ia в комплексе с HugB (PDB ID 6IY9) [Iino et al., 2013; Takenoya et al., 2019].

Далее проводили тестирование уровня устойчивости к неомицину и гигромицину методом анализа минимальных ингибирующих концентраций клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих рекомбинантные плазмиды pET32a, pET32a:*aphSR2* и pET32aM:*aphSR2/pkSR1*. При этом

значения МИК определяли как самую низкую концентрацию антибиотика, которая приводила к полному ингибированию роста (что определялось спектрофотометрически при OD₆₂₅).

В результате МИК неомицина контрольного штамма *E. coli* BL21(DE3) составляла 8 мкг/мл; индукция экспрессии гена *aphSR2* увеличивала МИК до 16 мкг/мл, совместная экспрессия генов *pkSR1* и *aphSR2* обуславливала повышение МИК до 32 мкг/мл.

Было установлено, что при совместном клонировании в *E. coli* *aphSR2* обуславливает устойчивость к неомицину, которая моделируется *pkSR1*.

Таким образом, *AphSR2* является второй аминогликозидфосфотрансферазой стрептомицетов и в частности *S. rimosus*, для которой полученные данные показывают, что уровень устойчивости повышается СТПК и является кумулятивным результатом их совместной экспрессии в *E. coli*.

3.5. Клонирование остальных 11 *aph*-генов *Streptomyces rimosus* в *Escherichia coli*, анализ экспрессии и устойчивости к аминогликозидным антибиотикам

Согласно проведенному филогенетическому анализу (представленному подробнее в разделе 3.2 данной работы), только 3 гена – *aphSR5* (*aphVIII*), *aphSR3* и *aphSR2* относятся к известным подсемействам. Остальные 11 аминогликозидфосфотрансфераз (*aphSR1*, *aphSR4*, *aphSR6*, *aphSR7*, *aphSR8*, *aphSR9*, *aphSR10*, *aphSR11*, *aphSR12*, *aphSR13*, *aphSR14*) нельзя отнести ни к одному из описанных и изученных ранее подсемейств [Shakya et al., 2011], так как они расположены на дереве вне их кластеров. Однако проведено клонирование указанных выше 11 генов *aph* в штаммы *E. coli* в составе экспрессионного вектора pET16b по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI по схеме, аналогичной изображенной на рисунке 26.

Для проверки результатов амплификации проводили электрофорез в 1% агарозном геле. Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием маркера λ DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas, США), все анализируемые клоны содержали целевую генетическую конструкцию. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и секвенировали для подтверждения идентичности исходному гену.

На следующем этапе работы проверяли экспрессию клонированных генов *aph* в штаммах *E. coli*. С целью подбора экспрессионного штамма полученными гибридными плазмидами трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). Анализ экспрессии в *E. coli* показал, что только 4 из этих генов (*aphSR4*, *aphSR8*, *aphSR12*, *aphSR13*) экспрессируются в

анализируемых условиях. Остальные 7 *aph*-генов (*aphSR1*, *aphSR6*, *aphSR7*, *aphSR9*, *aphSR10*, *aphSR11*, *aphSR14*) не экспрессируются в штамме *E. coli* BL21(DE3).

Далее проверяли устойчивость штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего гены *aphSR4*, *aphSR8*, *aphSR12*, *aphSR13*, к аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков. При этом анализ устойчивости показал, что данные гены не обуславливают устойчивость к аминогликозидам, а, вероятно, имеют другие функции.

Были проверены условия выделения белков из штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего гены *aphSR4*, *aphSR8*, *aphSR12*, *aphSR13*. Установлено, что в нативных условиях выделялся только белок AphSR4. На следующем этапе работы проводили наработку биомассы *E. coli*, содержащую ген *aphSR4*, с использованием ферментера (Biotronix, Корея) с целью проведения кристаллизации и получения 3D структуры данного фермента (коллегами из НИЦ Курчатовский институт под руководством К. Бойко).

Ниже приведена таблица, суммирующая и обобщающая результаты по клонированию всех четырнадцати генов *aph* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в *E. coli*, а также по выделению белков Aph и наличию трехмерных структур (таблица 20).

Таблица 20. Клонирование, экспрессия и определение устойчивости к антибиотикам генов *aphSR1-SR14* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в *E. coli*.

№	Экспрессия в <i>E. coli</i> pET16b	Устойчивость к антибиотикам	Выделение белка	Получение 3D структуры
<i>aphSR1</i>	-	Не проявляет	-	-
<i>aphSR2</i>	+	Неомицин, гигромицин	В денатурирующих условиях	-
<i>aphSR3</i> [<i>aph(3'')-Id</i>]	+	Стрептомицин (150 мкг/мл)	В нативных условиях	В нативной форме, в комплексе со стрептомицином
<i>aphSR4</i>	+	Не обнаружено	В нативных условиях (лизис на 50%)	3D структура в работе
<i>aphSR5</i> [<i>aph(3')-VIII</i>]	+	Канамицин (350 мкг/мл), неомицин (30 мкг/мл), паромомицин (60 мкг/мл)	В нативных условиях, работа проводилась ранее	В нативной форме, работа проводилась ранее
<i>aphSR6</i>	-	Не проявляет	-	-
<i>aphSR7</i>	-	Не проявляет	-	-

<i>aphSR8</i>	+	Не обнаружено	-	-
<i>aphSR9</i>	-	Не проявляет	-	-
<i>aphSR10</i>	-	Не проявляет	-	-
<i>aphSR11</i>	-	Не проявляет	-	-
<i>aphSR12</i>	+	Не обнаружено	-	-
<i>aphSR13</i>	+	Не обнаружено	-	-
<i>aphSR14</i>	-	Не проявляет	-	-

* Термин «не проявляет» использован в отношении устойчивости клеток *E. coli*, содержащих генетические конструкции, не проявившие экспрессию в анализируемых штаммах. Термин «не обнаружено» использован в отношении анализа устойчивости клеток *E. coli*, содержащих генетические конструкции, экспрессировавшиеся в анализируемых штаммах, но не продемонстрировавшие влияние на устойчивость к аминогликозидным антибиотикам.

Таким образом, было показано, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 устойчив к большинству аминогликозидных антибиотиков, однако, при исследовании *Aph* данного штамма было выявлено только 3 из 14 генов – *aph(3')-VIII*, *aph(3'')-Id* и *aphSR2*, обуславливающих устойчивость к антибиотикам.

3.6. Проведение транскрипционного анализа экспрессии генов резистоста штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970

3.6.1. Подбор субингибирующих концентраций антибиотиков

Поиск концентраций антибиотика для индукции экспрессии генов резистоста штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 был проведен с использованием среды YEME. Для проведения анализа использовали аминогликозидные антибиотики стрептомицин и канамицин. Субингибирующую концентрацию антибиотиков определяли как концентрацию, при которой КОЕ культуры *S. rimosus* после 24-часовой инкубации в жидкой среде, содержащей антибиотик, оставалось таким же, как КОЕ культуры, выращенной без антибиотика.

При подборе использовался широкий диапазон концентраций от 60 нг/мл до 20 мкг/мл, определяемый методом двукратных разведений. Эксперимент проведен в трех независимых повторях.

3.6.2. Анализ устойчивости культуры *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 к антибиотикам при индукции стрептомицином в субингибирующей концентрации

Для проведения исследования по изучению механизмов индукции лекарственной устойчивости штамма *S. rimosus* ATCC 10970 были определены концентрации антибиотиков (потенциальных индукторов), не влияющие на динамику роста культуры клеток данного штамма. В качестве индукторов были выбраны аминогликозидные антибиотики стрептомицин и канамицин, субингибирующие концентрации которых составили 30 нг/мл и 60 нг/мл соответственно. Оценка уровня индукции лекарственной устойчивости проводилась для широкого спектра антибиотиков, принадлежащих к различным химическим группам.

При помощи метода стандартных дисков было исследовано 39 антибиотиков, результаты приведены в таблице 21 (приведены усредненные результаты трех независимых измерений \pm стандартные отклонения). Диаметры зон отсутствия роста вокруг бумажных дисков анализировали относительно контроля – культуры *E. coli*, выращиваемой в жидкой среде без добавления индукторов.

Таблица 21. Диаметры зон ингибирования роста, определяемые при анализе устойчивости к антибиотикам штамма *S. rimosus* ATCC 10970.

№	Химическая группа антибиотика	Название антибиотика	Концентрация антибиотика, мкг/мл	Диаметр зоны отсутствия роста, мм		
				Контроль	индукция Km	индукция Sm
1	Карбапенемы	Имипенем	10	10 \pm 0,8	10 \pm 0,8	10 \pm 0,8
2		Меропенем	10	7 \pm 0,8	7 \pm 0,8	7 \pm 0,7
3	Противо-туберкулез. ср-ва	Рифампин	2	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5
4		Рифампицин	5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4
5	Макролиды	Спирамицин	100	13 \pm 0,7	13 \pm 0,7	13 \pm 0,7
6		Эритромицин	15	9 \pm 0,6	12 \pm 0,7	10,5 \pm 0,7
7		Олеандомицин	15	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4
8		Телитромицин	15	14 \pm 0,9	14 \pm 0,9	14 \pm 0,8
9	β -лактамы	Азтреонам	30	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4
10		Амоксициллин	25	6,5 \pm 0,4	6,5 \pm 0,4	6,5 \pm 0,5
11	Цефалоспорины	Цефепим	30	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5
12	Фторхинолоны	Моксифлоксацин	5	11 \pm 0,8	11 \pm 0,8	11,5 \pm 0,7
13		Левифлоксацин	5	11 \pm 0,7	11 \pm 0,7	11 \pm 0,7
14		Спарфлоксацин	5	12 \pm 0,7	12 \pm 0,7	12 \pm 0,7
15		Циноксанцин	100	6,5 \pm 0,4	6,5 \pm 0,4	6,5 \pm 0,5
16		Перфлоксацин	5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4
17		Ломефлоксацин	10	7 \pm 0,5	7 \pm 0,5	7 \pm 0,5
18		Норфлоксацин	10	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4
19		Гатифлоксацин	5	7 \pm 0,5	7 \pm 0,5	7 \pm 0,5
20		Хинолоны	Оксолиновая к-та	2	6,5 \pm 0,4	6,5 \pm 0,4
21	Налидикс. к-та		30	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,4

22	Тетрациклины	Тетрациклин	30	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$
23		Окситетрациклин	30	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$
24	Линкозамиды	Линкомицин	10	$7 \pm 0,5$	$7 \pm 0,5$	$7 \pm 0,5$
25		Клиндамицин	2	$8 \pm 0,5$	$8 \pm 0,5$	$8 \pm 0,5$
26	Хлорамфеникол	Хлорамфеникол	30	$12 \pm 0,8$	$12 \pm 0,8$	$12,5 \pm 0,9$
27	Оксазолидиноны	Линезолид	10	$18 \pm 0,9$	$18 \pm 0,9$	$18 \pm 0,9$
28	Полипептиды	Полимиксин В	50	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,4$
29	Гликопептиды	Ванкомицин	30	$9 \pm 0,5$	$9 \pm 0,5$	$9 \pm 0,5$
30	Аминогликозиды	Стрептомицин	30	$6,5 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,4$
31	Аминогликозиды	Канамицин	30	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$7 \pm 0,5$
32		Неомицин	30	$8 \pm 0,5$	$8 \pm 0,5$	$8 \pm 0,5$
33		Амикацин	30	$11 \pm 0,6$	$11 \pm 0,6$	$11 \pm 0,6$
34		Тобрамицин	10	$13 \pm 0,6$	$13 \pm 0,6$	$13 \pm 0,6$
35		Гентамицин	10	$10 \pm 0,6$	$10 \pm 0,6$	$10 \pm 0,6$
36		Сизомицин	10	$9 \pm 0,5$	$9 \pm 0,5$	$10 \pm 0,5$
37		Нетилмицин	10	$11 \pm 0,5$	$11 \pm 0,5$	$11 \pm 0,5$
38		Изепамицин	30	$12 \pm 0,6$	$12 \pm 0,6$	$13 \pm 0,7$
39		Спектиномицин	100	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,4$

Как следует из данных, представленных в таблице 21, под действием на культуру клеток *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 аминогликозидных антибиотиков стрептомицина и канамицина, не было обнаружено значимых изменений зон ингибирования роста и индукции устойчивости к аминогликозидным антибиотикам. Однако, было достоверно установлено повышение чувствительности культуры *E. coli* к макролидному антибиотику эритромицину, как при индукции канамицином, так и стрептомицином. Данный факт позволяет предположить, экспрессия генов *aph* не являются индуцибельной, а также, что существуют и другие, более сложные механизмы регуляции устойчивости штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 к антибиотикам различных химических классов.

При проведении биоинформатического анализа генов *aph* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и анализе генетического окружения данных генов было установлено, что в окружении *aph*-генов находятся гены нескольких семейств транскрипционных факторов, регулирующих устойчивость к антибиотикам у других микроорганизмов [Romero-Rodriguez et al., 2015]. В окружении гена *aphSR3* находятся гены двух транскрипционных факторов – транскрипционный регулятор семейства LysR (ELQ83810.1) и транскрипционный регулятор семейства TetR (ELQ83818.1), в окружении гена *aphSR4* – транскрипционный регулятор семейства MarR (ELQ83437.1), в окружении гена SR12 – транскрипционный фактор WhiB (ELQ79847.1). На основании этих данных было сделано предположение, что данные факторы транскрипции могут регулировать экспрессию исследуемых генов *aph*.

Таким образом, для проведения транскрипционного анализа генов резистоста *S. rimosus* ATCC 10970 были отобраны гены *aph* и 4 транскрипционных факторов: *tetR*, *marR*, *lysR*, *whiB*.

3.6.3. Изучение экспрессии *aph*-генов при выращивании штамма *Streptomyces rimosus subsp. rimosus* ATCC 10970 в присутствии аминогликозидных антибиотиков

На следующем этапе работы изучали экспрессию генов резистоста штамма *S. rimosus* ATCC 10970, анализируя уровень экспрессии как генов *aph*, так и четырех транскрипционных факторов, отобранных на предыдущем этапе работы.

Для определения оптимального времени индукции и уточнение временных интервалов фаз роста проводили выращивание штамма *S. rimosus subsp. rimosus* ATCC 10970 в жидкой среде YEME, данные представлены на рисунке 40.

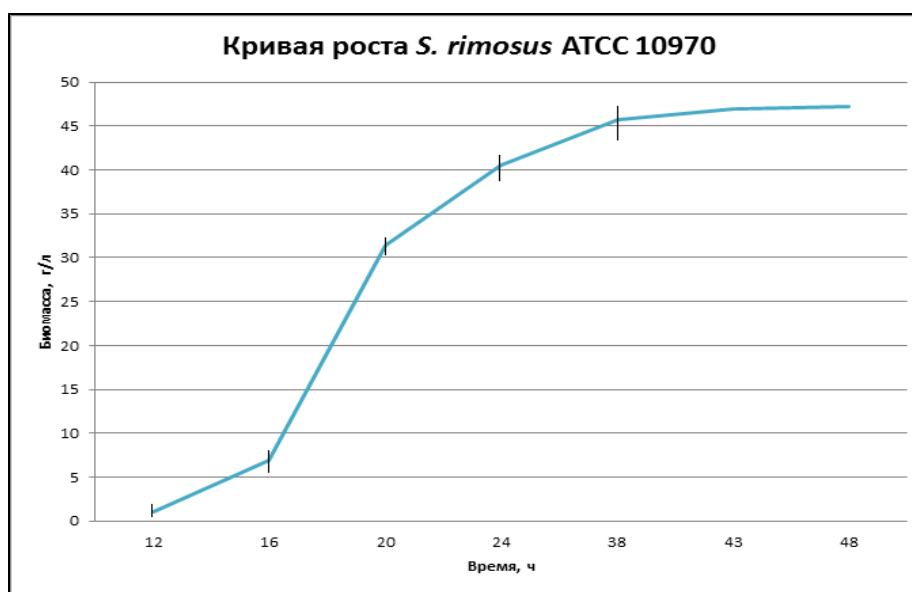


Рисунок 40. Изучение особенностей роста штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в жидкой среде.

Далее проводили транскрипционный анализ экспрессии изучаемых генов резистоста *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 по методике, описанной в разделе 2.9 данной работы. При проведении транскрипционного анализа использовали пробы: до добавления антибиотика в растущую культуру в логарифмической фазе (точка «0»), без индукции через 1 час после точки «0» (точка «1», контроль) и при односторонней индукции в субингибирующей концентрации (точка «S1»). Уровень экспрессии анализируемых генов резистоста, *aphSR1-14*, *marR*, *tetR*, *lysR* и *whiB*, нормировался по уровню экспрессии генов домашнего хозяйства штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970: *polA* (DNA polymerase I, locus tag NH08_RS0130905) и *GTPase* (GTPase Era, locus tag NH08_RS0100045).

На основании полученных методами стандартных дисков и ПЦР в реальном времени данных было установлено, что стрептомицин и канамицин не являются индукторами генов *aph*

штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. При этом добавление стрептомицина индуцировало экспрессию гена транскрипционного регулятора *tetR* (рисунок 41). Транскрипционный регулятор *tetR* может выполнять функцию регуляции генов устойчивости к тетрациклину и, вероятно, не принимает участие в регуляции устойчивости к аминогликозидным антибиотикам. Транскрипционные регуляторы семейства *tetR* являются третьей по распространенности среди бактерий группой регуляторов, связанных со вторичным метаболизмом [Ramos et al., 2005]. У представителей рода *Streptomyces* большое количество генов *tetR* расположены в кластерах генов регуляции биосинтеза антибиотиков и устойчивости к ним. Часто они регулируют экспрессию протонных помп, обеспечивающих активный транспорт антибиотиков из клетки, например, гены *actR* и *pqrA* *S. coelicolor*, *lanK* штамма *S. cyanogenus* S136, *ebrS* штамма *S. lividans* и многие другие [Hirano et al., 2008; Romero-Rodrigues et al., 2015].

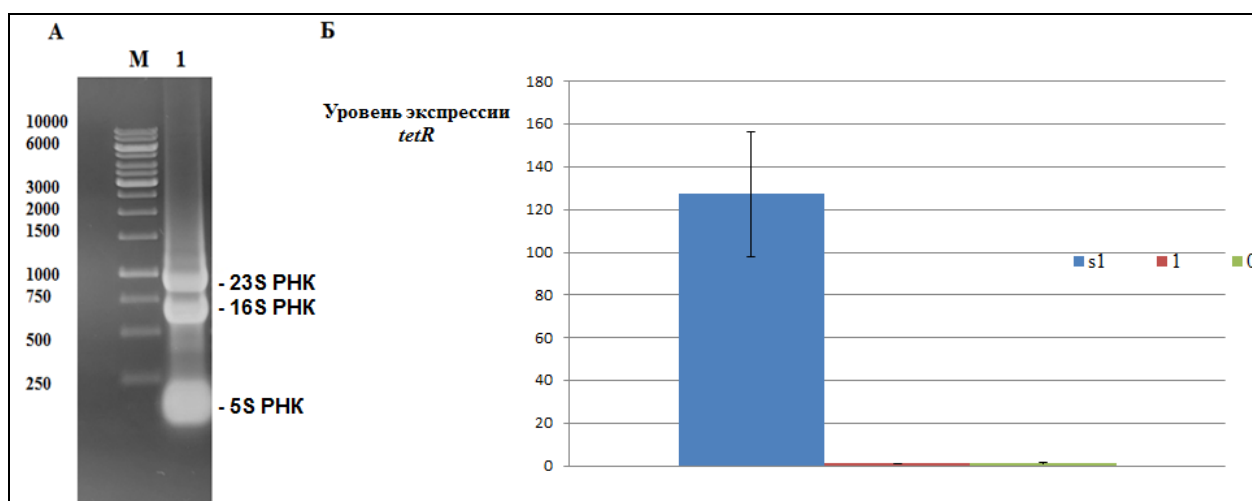


Рисунок 41. Транскрипционный анализ экспрессии генов резистоста штамма *S. rimosus* ATCC 10970: А – Электрофорез выделенной РНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970 (РНК не денатурирована перед постановкой электрофореза), где 1 – тотальная РНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970, М - маркер SM0313 (Fermentas, Литва);

Б – Экспрессия гена транскрипционного регулятора *tetR* после одночасовой индукции стрептомицином в субингибирующей концентрации – точка «S1», в точке перед добавлением стрептомицина в растущую культуру в логарифмической фазе – «0», без индукции стрептомицином через 1 час после точки «0» – точка «1».

Таким образом, было установлено, что стрептомицин индуцирует не связанный с аминогликозидфосфотрансферазами механизм устойчивости к антибиотикам, при этом наблюдается индукция экспрессии гена *tetR*.

3.7. Другие гены, обуславливающие устойчивость штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам

3.7.1. Биоинформатический анализ *aac* и *ant* генов *Streptomyces rimosus* ATCC 10970

Ранее в рамках данной работы было показано, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 устойчив к большинству аминогликозидных антибиотиков, однако, при исследовании Aph данного штамма было выявлено только 3 из 14 генов – *aph(3')-VIII*, *aph(3'')-Id* и *aphSR2*, обуславливающих устойчивость к антибиотикам. В связи с этим фактом было сделано предположение, что устойчивость к аминогликозидным антибиотикам у данного штамма может быть обусловлена не только аминогликозидфосфотрансферазами, но и другими ферментами, такими, как аминогликозид ацетилтрансферазами и аминогликозид нуклеотидилтрансферазами.

При биоинформатическом анализе в геноме штамма *S. rimosus* ATCC 10970 был выявлен один ген, аннотированный как аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза, обозначенный как *aacSR*. Гены аминогликозид нуклеотидилтрансфераз в геноме штамма *S. rimosus* ATCC 10970 отсутствуют.

Ген *aacSR* имеет номер в GenBank ELQ81679 (SRIM_19072) и расположен в кластере генов, связанных с метаболизмом и транспортом веществ (таблица 22).

Таблица 22. Генетическое окружение и расположение в кластере гена *aacSR*.

Название гена и кодируемого им белка	Locus_tag	Позиции начала и конца в хромосоме
Гипотетический белок	SRIM_19042	24657-25520
Белок tRNA/хеликазного типа, связывающий нуклеиновые кислоты	SRIM_19047	25524-25874
Двухкомпонентный регулятор	SRIM_19052	26003-26686
Двухкомпонентная сенсорная киназа	SRIM_19057	26811-29378
ABC транспортер мембранного типа	SRIM_19062	29533-31452
ABC транспортер	SRIM_19067	31456-32280
Аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза	SRIM_19072	32454-32993
Калий-транспортер АТРаза субъединица С	SRIM_19077	33071-33724
Калий-транспортер АТРаза субъединица В	SRIM_19082	33731-35845
Калий-транспортер АТРаза субъединица А	SRIM_19087	35887-37563
Мембранный белок	SRIM_19092	37572-37661
Гипотетический белок	SRIM_19097	37776-38774

Белок *AacSR* состоит из 179 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 19,317 кДа, изоэлектрическая точка $pI=4,7$. Доменная структура белка представлена

регионом "N-acetyltransferase" (9-168 а/к) и сайтом связывания Коэнзима А "Coenzyme A binding pocket [chemical binding]" (82-84, 94-95). Молекулярная функция белка - трансферазная активность.

По программе BLAST определяли гомологию аминокислотной последовательности белка AacSR с последовательностями белков аминогликозид ацетилтрансфераз других видов и родов актинобактерий. По программе SAS предсказывали структуру белка AacSR и определяли гомологию с известными 3D структурами аминогликозид ацетилтрансфераз. Ближайшим гомологом белка AacSR является аминогликозид 2'-N-ацетилтрансфераза *Mycobacterium tuberculosis* (процент идентичности аминокислотных последовательностей составляет 51%), которая вносит частичный вклад в устойчивость к широкому спектру аминогликозидов и связан с другими бактериальными функциями (Приложение 3).

3.7.2. Клонирование гена аминогликозид ацетилтрансферазы *aacSR* в *Escherichia coli*

Гены аминогликозидацетилтрансфераз у актинобактерий рода *Streptomyces* ранее никогда не изучались. Клонирование гена аминогликозид 2'-N-ацетилтрансферазы *S. rimosus* ATCC 10970 *aacSR* в *E. coli* проводили в составе экспрессионного вектора pET16b. Амплификацию гена *aacSR* осуществляли с геномной ДНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970 методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов AacSR-fv и AacSR-rev. Фрагмент клонировали в составе мультикопийного экспрессионного вектора pET16b по сайтам эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *BamHI*. Полученной гибридной плазмидой pET16b:*aacSR* трансформировали компетентные клетки экспрессионных штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3). Для контроля штаммы *E. coli* трансформировали исходным вектором pET16b.

Для проверки экспрессии гена *aacSR* в *E. coli* проводили выращивание в жидкой среде LB с индукцией 0.1, 0.5 и 1.0 mM ИПТГ, затем клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при +4°C, после чего ресуспендировали в Sample буфере и анализировали экспрессию в *E. coli* с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле.

Анализ электрофореграммы показал, что ген *aacSR* не экспрессируется в *E. coli* в составе экспрессионного вектора pET16b. В связи с этим, проводили клонирование гена *aacSR* в составе экспрессионного вектора pET32a, содержащего последовательность гена тиоредоксина в N-концевой области.

Амплификацию гена *aacSR* осуществляли с геномной ДНК штамма *S. rimosus* методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов: AacSR2-fv и AacSR2-rev. Амплифицированный фрагмент клонировали в составе мультикопийного экспрессионного вектора pET32a по сайтам

эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. Полученной лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5a. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР с использованием стандартных праймеров: S.Tag и T7term.

Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проводили рестрикционный анализ на наличие вставки.

Полученной гибридной плазмидой рЕТ32а:*aacSR* трансформировали компетентные клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3). Для контроля штаммы *E. coli* трансформировали вектором рЕТ32а без вставки. Для проверки экспрессии гена *aacSR* штаммы *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащие плазмиду рЕТ32а:*aacSR*, выращивали в жидкой среде LB с индукцией 0,5 и 1,0 мМ ИПТГ. Результаты представлены на рисунке 42.

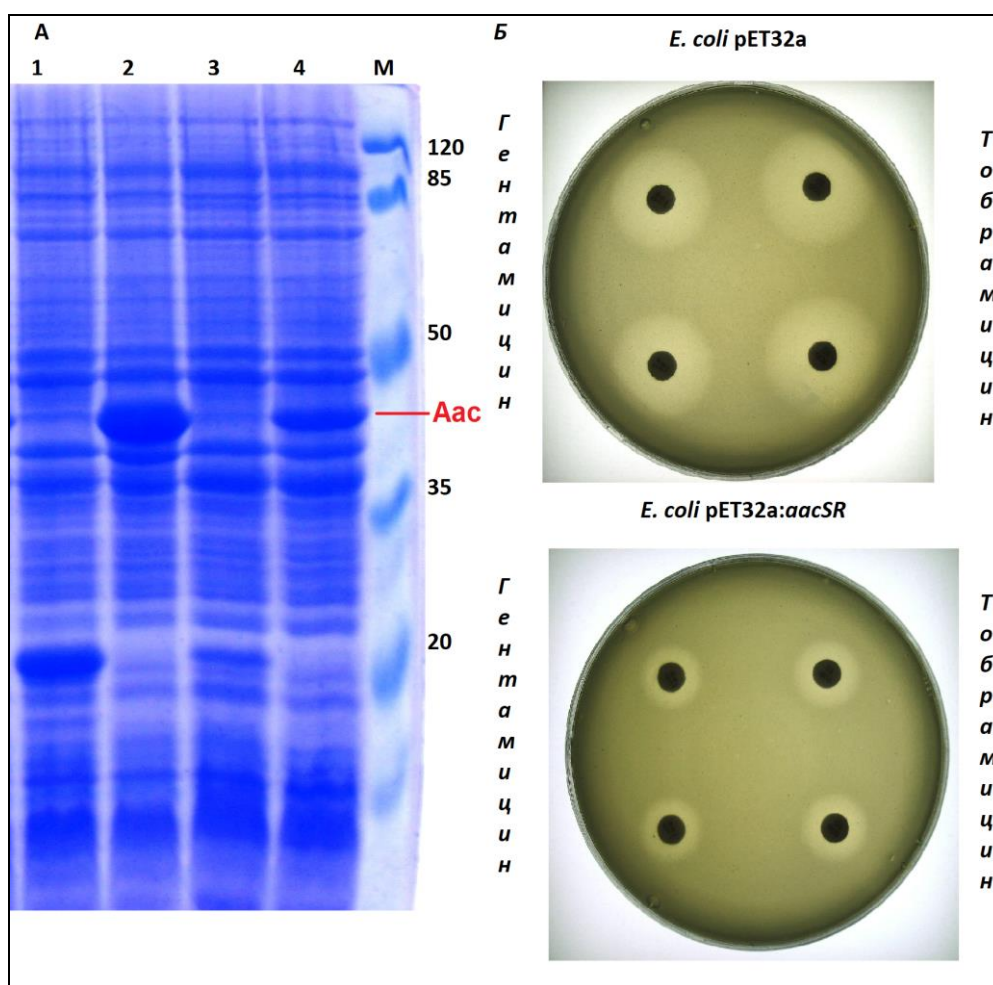


Рисунок 42. Изучение ацетилтрансферазы AacSR:

А – Электрофорез растворимой фракции белков штаммов *E. coli*: 1-2 *E. coli* BL21(DE3), 3-4 *E. coli* NiCo21(DE3), содержащие плазмиды: 1 и 3 – рЕТ32а, 2 и 4 – рЕТ32а:*aacSR*; М – маркер молекулярной массы белков SM0441 (Fermentas, Литва);

Б – Устойчивость клеток *E. coli* рЕТ32а:*aacSR* к гентамицину и тобрамицину.

Было установлено, что в клетках обоих штаммов *E. coli* наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 37 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка AacSR в сумме с молекулярной массой белка всего линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин (рисунок 42А). Максимальная экспрессия гена *aacSR* была установлена в штамме *E. coli* BL21(DE3). Данный штамм был выбран для проведения дальнейших этапов работы.

3.7.3. Исследование спектра устойчивости клеток *Escherichia coli*, содержащих ген *aacSR* к аминогликозидным антибиотикам

Проверена устойчивость штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащий ген *aacSR* к различным аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков. Было установлено, что экспрессия гена *aacSR* обеспечивает устойчивость клеток *E. coli* к широкому спектру аминогликозидов, таких как неомицин, гентамицин, тобрамицин, сизомицин, нетилмицин, изепамицин и паромомицин (таблица 23 и рисунок 42Б).

Таблица 23. Исследование спектра устойчивости *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a:*aacSR*, к аминогликозидным антибиотикам.

Антибиотики		<i>E. coli</i> pET32a	<i>E. coli</i> pET32a: <i>aacSR</i>
Название	Концентрация	Диаметр зоны, мм	
Канамицин	30 мкг/диск	21±0.5	21±0.5
Неомицин	30 мкг/диск	20±0.5	15±0.5
Амикацин	30 мкг/диск	24±0.5	24±0.5
Стрептомицин	10 мкг/диск	22±0.5	22±0.5
Гентамицин	10 мкг/диск	22±0.6	15±0.5
Тобрамицин	10 мкг/диск	26±0.5	17±0.5
Сизомицин	10 мкг/диск	25±0.5	19±0.5
Нетилмицин	10 мкг/диск	26±0.5	20±0.5
Гигромицин	100 мкг/диск	18±0.5	18±0.5
Изепамицин	30 мкг/диск	26±0.5	16±0.5
Паромомицин	10 мкг/диск	17±0.5	7±0.4

*Примечание. Приведены усредненные результаты четырех независимых измерений ± стандартные отклонения.

Таким образом, ген ацетилтрансферазы *aacSR* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 был клонирован в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3). Показана устойчивость клеток *E. coli* pET32a:*aacSR* к широкому спектру аминогликозидных антибиотиков. В соответствии с информацией из литературных данных по ранее исследованным ацетилтрансферазам из штаммов клинических изолятов, ферменты данной группы обеспечивают устойчивость к нескольким антибиотикам и являются примером механизма полиантибиотикорезистентности. Так, *aac(б')-Im* обеспечивает устойчивость клеток *E. coli* к широкому спектру 4,6-дизамещенных аминогликозидов – тобрамицину, амикацину, канамицину, изепамицину, нетилмицину и сизомицину [Smith et al., 2017]. В статье [Sanz-Garsia et al., 2019] подробно описываются ацетилтрансферазы различных штаммов микобактерий, например, *aac(2')-I* обеспечивает устойчивость *M. tuberculosis* к таким аминогликозидам как гентамицин, тобрамицин и нетилмицин.

В рамках дальнейшей работы будет проводиться изучение уровня устойчивости клеток *E. coli*, содержащих ген *aacSR* к аминогликозидным антибиотикам, отобранных на предыдущем этапе работы по определению спектра устойчивости. В отношении аминогликозидных антибиотиков неомицина, гентамицина, тобрамицина, сизомицина и нетилмицина будет определен уровень устойчивости при помощи двух методов – линейных разведений и минимальных ингибирующих концентраций.

По данному направлению работы подана заявка на грант РФФИ проект № 20-04-00092А от 19 июня 2019 г.

Заключение

Анализ генома *S. rimosus* ATCC 10970 [Pethick et al., 2013] позволил нам идентифицировать 14 генов, аннотированных как *aph*, включая *aphVIII* [Sizova et al., 2002]. Исходя из филогенетического сходства, только три из 14 генов, *aphSR5* (*aphVIII*), *aphSR3* и *aphSR2*, были отнесены к известным подсемействам Aph(3'), Aph(3'') и Aph(7'') соответственно.

Гены *aph*, принадлежащие к подсемейству Aph(3''), являются собой стрептомицин-фосфотрансферазами. Известно, что устойчивость к стрептомицину, опосредованная аминогликозидфосфотрансферазами, является результатом действия двух классов ферментов – Aph(3') и Aph(6). [Wright and Thompson, 1999]. Филогенетический анализ фосфотрансфераз, из клинических штаммов бактерий и продуцентов аминогликозидных антибиотиков [Shakya et al., 2011] и четырнадцати Aph *S. rimosus* ATCC10970 показал, что AphSR3 принадлежит к подсемейству Aph(3''). Ранее были описаны гены *aph(3'')*: *aph(3'')-Ia* у продуцента стрептомицина *Streptomyces griseus* [Heinzel et al., 1988], *aph(3'')-Ib* на плазмиде RSF1010 *Escherichia coli* [Scholz et al., 1989] и *aph(3'')-Ic* у *Mycobacterium fortuitum* [Ramón-García et al., 2006]. Многократное выравнивание последовательностей выявило, что AphSR3 имеет все консервативные домены, характерные для подсемейства APH (3'') [Heinzel et al., 1988; Wright and Thompson, 1999; Ramón-García et al., 2006]. Ген *aphSR3* был назван нами как *aph(3'')-Id*.

Анализ устойчивости к аминогликозидным антибиотикам показал, что ген *aph(3'')-Id*, обуславливает устойчивость клеток *E. coli* к стрептомицину. Белок Aph(3'')-Id (AphSR3) впервые выделен в нативных условиях. Оценка фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro* с помощью двух методов показала, что белок Aph(3'')-Id является ферментативно активным и способен катализировать фосфорилирование субстрата – аминогликозидного антибиотика стрептомицина.

Способность новой идентифицированной стрептомицин-фосфотрансферазы подвергаться аутофосфорилированию *in vitro* является уникальным свойством для этого класса ферментов. Это свойство хорошо известно для эукариотических серин-треониновых и тирозин протеинкиназ [Hashimoto et al., 2008], а также для бактериальных серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа [Damle et al., 2014]. Аутофосфорилирование является важным механизмом регуляции биологической активности протеинкиназ. Однако в литературе отсутствуют данные об аутофосфорилировании аминогликозидфосфотрансфераз. Следует отметить, что аутофосфорилирование серина/треонина и тирозина является уникальным свойством для данной группы ферментов.

Также в работе исследовали возможность влияния серин-треониновых протеинкиназ на повышение устойчивости к аминогликозидным антибиотикам при совместном клонировании в *E. coli* гена *aphSR2* и генов СТПК *pkSR1* и *pkSR2*, локализованных в одном кластере генома *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. Клонирование в *E. coli* гена *pkSR1* придает устойчивость к неомицину и гигромицину. *E. coli*, содержащая *pkSR1* обладает повышенной устойчивостью к неомицину, совместная экспрессия генов *aphSR2* и *pkSR1* приводит к повышению уровня устойчивости в два раза. Представленные данные являются вторым примером влияния СТПК на модуляцию уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам у бактерий рода *Streptomyces*. Показано, что AphSR2 является второй аминогликозидфосфотрансферазой стрептомицетов и в частности *S. rimosus*, для которой полученные данные показывают, что уровень устойчивости повышается СТПК и является аккумулятивным результатом их совместной экспрессии.

Штамм *S. rimosus* ATCC 10970 устойчив к большинству аминогликозидных антибиотиков, однако, при исследовании Aph данного штамма было выявлено только три из четырнадцати генов – *aph(3')-VIII*, *aph(3'')-Id* и *aphSR2*, обуславливающих устойчивость к антибиотикам. В связи с этим фактом, было сделано предположение, что устойчивость к аминогликозидным антибиотикам у данного штамма может быть обусловлена не только аминогликозидфосфотрансферазами, но и другими ферментами, такими, как аминогликозид ацетилтрансферазами и аминогликозид нуклеотидилтрансферазами.

При биоинформатическом анализе в геноме штамма *S. rimosus* ATCC 10970 был выявлен один ген, аннотированный как аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза, гены аминогликозид нуклеотидилтрансфераз в геноме штамма *S. rimosus* ATCC 10970 отсутствуют. Ген ацетилтрансферазы *aacSR* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 был клонирован в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3). Показана устойчивость клеток *E. coli* pET32a:*aacSR* к широкому спектру аминогликозидных антибиотиков. В рамках дальнейшей работы будет проводиться изучение уровня устойчивости клеток *E. coli*, содержащих ген *aacSR* к аминогликозидным антибиотикам.

Описанные в настоящей работе механизмы устойчивости к аминогликозидным антибиотикам штамма *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 представлены в виде схемы на рисунке 43.

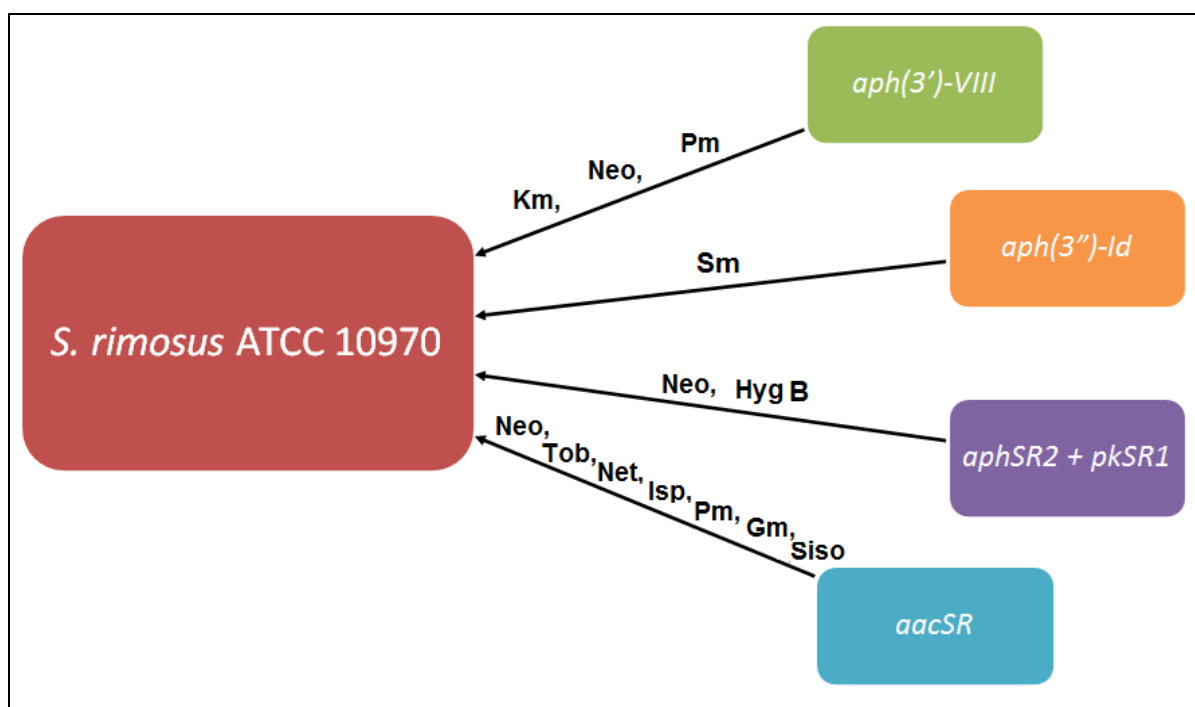


Рисунок 43. Гены, обуславливающие устойчивость штамма *S. rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам.

Таким образом, в работе была изучена экспрессия генов резистоста *S. rimosus* ATCC 10970, проанализированы структурно-функциональные характеристики аминогликозид-трансфераз, ферментов, перспективных для биотехнологии, фармацевтики, медицины и учреждений, занимающихся созданием лекарств нового поколения. Полученные результаты расширяют значение актиномицетов как природного резервуара генов лекарственной устойчивости и позволяют развивать подходы, применяемые для преодоления резистентности к аминогликозидным антибиотикам.

Выводы

- 1) Впервые для актинобактерий рода *Streptomyces*, не являющихся продуцентами аминогликозидных антибиотиков, для штамма *S. rimosus* ATCC 10970 идентифицирован ген *aph(3'')-Id*, кодирующий стрептомицин фосфотрансферазу, биохимически охарактеризован фермент Aph(3'')-Id;
- 2) Впервые для семейства аминогликозид-модифицирующих ферментов бактерий показана способность к автофосфорилированию *in vitro*, на примере фермента аминогликозид-фосфотрансферазы Aph(3'')-Id;
- 3) Впервые для аминогликозидфосфотрансфераз подсемейства Aph(3'') получены трехмерные структуры белка Aph(3'')-Id из штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в апо-форме и в комплексе со стрептомицином и АДФ;
- 4) Установлено, что серин-треониновая протеинкиназа PkSR1 оказывают влияние на модуляцию уровня устойчивости к неомицину и гигромицину, кодируемого геном *aphSR2*;
- 5) Транскрипционный анализ экспрессии генов *aphSR1-14*, *marR*, *tetR*, *lysR*, *whiB* резистома *S. rimosus* ATCC 10970 выявил, что стрептомицин индуцирует экспрессию гена *tetR*.
- 6) В экспериментах *in vitro* на модели *E. coli* установлено, что устойчивость штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам гентамицину, тобрамицину, сизомицину, нетилмицину и изепамицину может быть обусловлена геном аминогликозид ацетилтрансферазы *aacSR*.

Список сокращений и условных обозначений

- 3D структура – трехмерная структура
- Aac – аминогликозид ацетилтрансфераза
- Ant – аминогликозид аденилтрансфераза
- Aph – аминогликозид фосфотрансфераза
- CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
- dNTPs – дезоксинуклеозидтрифосфаты
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил) -1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- LA – агаризованная среда Luria-Bertani
- LB – среда Luria-Bertani
- MALDI TOF – матричноактивированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия
- MOPS – 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота
- NTA – нитрилоуксусная кислота
- PMSF – фенилметансульфонилфлуорид
- PSA – персульфат аммония
- S, Ser – остаток серина
- SDS – додецилсульфат натрия
- SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле
- TEMED – тетраметилэтилендиамин
- АДФ – аденозиндифосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- КАС – ацетат калия
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- Об/мин – количество оборотов в минуту
- ПААГ – полиакриламидный гель
- П.н. – пар нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота

- СТПК – серин-треониновая протеинкиназа
- ТАЕ – трис-ацетат-ЭДТА
- ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин
- Трис – трис-оксиметиламинометан
- ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Список литературы

1. Алексеева, М. Г. Тест-система *Escherichia coli/aphVIII/gsk3β* для селективного скрининга ингибиторов серин-треониновой протеинкиназы GSK3β / М. Г. Алексеева, Д. А. Мавлетова, В. Н. Даниленко // Генетика. – 2018. – Т. 54. – №13. – С. 14-17.
2. Беккер, О. Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: *Escherichia coli APHVIII/Pk25* / О. Беккер, М. Алексеева, Д. Осолодкин, В. Палюлин, С. Елизаров, В. Даниленко // Acta Naturae. – 2010 – Т. 2 – № 3 – С. 126-139.
3. Даниленко, В. Н. Множественная устойчивость к антибиотикам у актиномицетов / В. Н. Даниленко, Г. Г. Пузынина, Н. Д. Ломовская // Генетика. – 1977. – Т. 13. – № 10. – С. 1831-1841.
4. Даниленко, В. Н. Определение нуклеотидной последовательности и характеристика нового аминогликозидфосфотрансферазного гена *aphVIII* из штамма *Streptomyces rimosus* / В. Н. Даниленко, К. Э. Акопянц, И. А. Сизова, Т. А. Мичурина // Молекулярная генетика. – 1977. – Т. 33. – № 11. – С. 1478-1486.
5. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров // М.: Изд-во МГУ. – 2004. – С. 528.
6. Елизаров, С. Идентификация сайтов фосфорилирования аминогликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus* / С. Елизаров, М. Алексеева, Ф. Новиков, Г. Чиллов и др. // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 11. – С. 1504–1512.
7. Елизаров, С. Зависимость активности APHVIII от серин-треониновых протеинкиназ у *Streptomyces rimosus* / С. Елизаров, О. Сергиенко, И. Сизова, В. Даниленко // Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39/ – № 2/ – С. 1-9.
8. Потехин, Я. Детерминант устойчивости к канамицину *Streptomyces rimosus*: амплификация в составе хромосомы и обратимая генетическая нестабильность / Я.А. Потехин, В.Н. Даниленко // Молекулярная биология. – 1985. – Т. 19. – № 3. – С. 805-811.
9. Решедько, Г. Значение ферментативной модификации аминогликозидов в развитии резистентности у бактерий / Г. Решедько // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 1999. – Т. 1. – № 1. – С. 40-50.
10. Сизова, И. Аминогликозид-3'-фосфотрансфераза из *Streptomyces rimosus*: сравнение с аминогликозид-3'-фосфотрансферазами из штаммов-продуцентов аминогликозидов и с эукариотическими протеинкиназами / И. Сизова, П. Хегеманн, М. Фурманн, В. Даниленко // Молекулярная биология. – 2002. – Т. 36. – № 1. – С. 1-10.
11. Стародубцева Л. И. Изучение явления амплификации детерминанта устойчивости к канамицину Km^r в составе сконструированных гибридных плазмид в штамме

- Streptomyces lividans* / Л. И. Стародубцева, А. С. Таисова, В.Н. Даниленко // Антибиотики и мед. биотехнология. – 1985. – № 5. – С. 565-572.
12. Aires, J.R. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides / J. R. Aires, T. Kohler, H. Nikaido, P. Plesiat // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – V. 43. – № 11. – P. 2624-2628.
 13. Ahn, J. Rv3168 phosphotransferase activity mediates kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / J. Ahn, K. Kim // Microbiol. Biotechnol. – 2013. – V. 23. – № 11. – P. 1529-1535.
 14. Alanis, A. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era / A. Alanis // Archives of medical research. – 2005. – V. 36. – № 6. – P. 697-705.
 15. Alekshun, M. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance / M. Alekshun, S. Levy // Cell. – 2007. – V. 128. – № 6. – P. 1038-1050.
 16. Ali, J. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments / J. Ali, Q. A. Rafiq, E. Ratcliffe E. // Future Sci OA. – 2018. – V. 4. – № 4. – FSO290 doi: 10.4155/fsoa-2017-0109.
 17. Amstutz, P. Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins / P. Amstrutz, H. Binz, P. Parizek, M. Stumpp, et al. // The journal of biol. chem. – 2005. – V. 280. – № 26. – P. 24715-24722.
 18. Anderson, A. S. The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of actinomycetes / A. S. Anderson, D. J. Clark, P. H. Gibbons, and J. M. Sigmund // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – V. 29. – № 2. – P. 60-69.
 19. Ashenafi M. Purification and characterization of aminoglycoside phosphotransferase APH(6)-Id, a streptomycin-inactivating enzyme / M. Ashefani, T. Ammosova, S. Nekhai, W. M. Byrnes // Mol. Cell Biochem. – 2014. – V. 387. – P. 207-216.
 20. Azucena, E. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition / E. Azucena, S. Mobashery // Drug resistance updates. – 2001. – V. 4. – № 2. – P. 106-117.
 21. Badarau, A. Aminoglycoside-(2'')- phosphotransferase type IIIa from *Enterococcus* / A. Badarau, Q. Shi, J. Chow, J. Zajiceket et al. // Biol. chem. – 2008. – V. 283. – № 12. – P. 7638-7647.
 22. Bakker, E. P. Aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics: hygromycin B is an atypical bactericidal compound that exerts effects on cells of *Escherichia coli* characteristics for bacteriostatic aminocyclitols / E.P Bakker // J. Gen. Microbiol. – 1992. – V. 138. – № 3. – P. 563-569.

23. Baranasic, D. Genome sequences of the oxytetracycline production strain *Streptomyces rimosus* R6-500 and two mutants with chromosomal rearrangements / D. Baranasic, J. Zucko, M. Nair, A. Pain et al. // *Genome Announc.* – 2014. – V. 17. – № 2. – doi: 10.1128/genomeA.00517-14.
24. Barka, E. A. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria / E. A. Barka, P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant et al. // *Mol. Biol. Rev.* – 2015. – V. 80. – №1. – P. 1-43.
25. Bates, D. Aminoglycoside ototoxicity / D. Bates // *Drugs Today.* – 2003. – V. 39. – P. 277 – 285.
26. Berthold, P. An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii* / P. Berthold, R. Schmitt, W. Mages // *Protist.* – 2002. – V. 153 – № 4. – P. 401-412. –doi: 10.1078/14344610260450136.
27. Becker, B. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century / B. Becker, M. Cooper // *ACS Chem. Biol.* – 2013. – № 8. – P. 105–115.
28. Bengtsson-Palme, J. Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes / J. Bengtsson-Palme, D.G. Larsson, E. Kristiansson // *J Antimicrob Chemother.* – 2017. – V. 72 – № 10. – P. 2690-2703. –doi: 10.1093/jac/dkx199.
29. Bentley, S.D. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 / S.D. Bentley, K.F. Chater, A.M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis et al. // *Nature.* – 2002. – V. 417 – P. 141-147. –doi: 10.1038/417141a.
30. Bérdy, J. Thought and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading / J. Bérdy // *J. Antibiot.* – 2012. – V. 65 – № 8. – P. 385–395.
31. Blair, J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance / J.M. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu et al. // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – V. 13 – № 1. – P. 42-51. –doi: 10.1038/nrmicro3380.
32. Block, M. Aminoglycosides / M. Block // *StatPearls Publishing.* – 2019. – 621.
33. Boehr, D. Broad-spectrum peptide inhibitors of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes / D. Boehr, K. Draker, K. Koteva, M. Bains et al. // *Chem. Biol.* – 2003. – №10 – P. 189–196.
34. Boyko, K.M. Structural characterization of the novel amino glycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation / K.M. Boyko, M.A. Gorbacheva, D.A. Korzhenevskiy, M.G. Alekseeva et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2016. – V. 477 – P. 595-601.
35. Boucek-Mechiche, K. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: Description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp.

- nov.* associated with common scab, and *S. reticuliscabie* sp. *nov.* associated with netted scab / K. Bouček-Mechiche, L. Gardan, P. Normand, B. Jouan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – №50 – P. 91-99.
36. Bryskier, A. Antibiotics and antibacterial agents: classifications and structure-activity relationships / A. Bryskier // *Antimicrobial Agents*. ASM Press. – 2005. – P. 13–38.
 37. Busse, H.J. The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins / H.J. Busse, C. Wostmann, E.P. Bakker // *J. Gen. Microbiol.* – 1992. – №138 – P. 551–561.
 38. Burk, D. Protein kinase inhibitors and antibiotic resistance / D. Burk, A. Berghuis // *Pharmacology & Therapeutics* – 2002. – №93 – P. 283–292.
 39. Burk, D. Structural analyses of nucleotide binding to an aminoglycoside phosphotransferase / D. Burk, W. Hon, A. Leung, A. Berghuis // *Biochem.* – 2001. – №40 – P. 8756–8764.
 40. Busscher, G. 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics / G. Busscher, F. Rutjes, F. Delft // *Chem. Rev.* – 2005. – №105 – P. 775–791.
 41. Carrillo, R. Production of extracellular heterologous proteins in *Streptomyces rimosus*, producer of the antibiotic oxytetracycline / R. Carrillo, V. Magdevska, L. Kranjc, Š. Fujs et al. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2018. – V. 102 – №6 – P. 2607-2620 –doi: 10.1007/s00253-018-8793-z.
 42. Carter, A. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics / A. Carter, W. Clemons, D. Brodersen, R. Morgan-Warren et al. // *Nature* – 2000. – №407 – P. 340–348.
 43. Chandrika, T.N. Comprehensive review of chemical strategies for the preparation of new aminoglycosides and their biological activities / T.N. Chandrika, S. Garneau-Tsodikova // *Chem Soc Rev.* – 2018. – V. 19 – №47(4) – P. 1189-1249.
 44. Cobb, R.E. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system / R.E. Cobb, Y. Wang, H. Zhao // *ACS Synth. Biol.* – 2015. – V.4 – P. 723–728 – dx.doi.org/10.1021/sb500351f.
 45. Crofts, T.S. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome / T.S. Crofts, A.J. Gasparrini, G. Dantas // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – V. 13 – №2 – P. 116-123 –doi: 10.1038/nrmicro3399.
 46. Daegelen, P. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3) / P. Daegelen, F. Studier, R. Lenski, S. Cure // *Mol. Biol.* – 2009. – V. 394 – P. 634–643.

47. Daigle, D.M. Inhibition of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes by protein kinase inhibitors / D.M. Daigle, G.A. McKay, G.D. Wright // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272 – №40 – P. 24755-24758.
48. Daigle, D.M. Aminoglycoside antibiotic phosphotransferases are also serine protein kinases / D.M. Daigle, G.A. McKay, P.R. Thompson, G.D. Wright // *Chem Biol.* – 1999. – V. 6– №1 – P. 11-18.
49. Damle, N.P. Mechanism of autophosphorylation of mycobacterial PknB explored by molecular dynamics simulations / N. P. Damle, D. Mohanty // *Biochemistry.* – 2014. – V. 53. – P. 4715-4726.
50. Danilenko, V.N. Search for inhibitors of bacterial and human protein kinases among derivatives of diazepines[1,4] annelated with maleimide and indole cycles / V.N. Danilenko, A.Y. Simonov, S.A. Lakatosh, M. Kubbutat et al. // *J Med Chem.* – 2008. – V. 51 – №24 – P. 7731-7736.
51. Davies, J. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics / J. Davies, G. Wright // *Trends in microbiology* – 1997. – V. 5– №6 – P. 234-240.
52. D'Costa, V.M. Sampling the antibiotic resistome / V.M. D'Costa, K.M. McGrann, D.W. Hughes, G.D. Wright // *Science* – 2006. – V. 311 – №5759 – P. 374-377.
53. Denapaite, D. Persistence of the chromosome end regions at low copy number in mutant strains of *Streptomyces rimosus* and *S. lividans* / D. Denapaite, A. Paravic' Radi_ evic', B. ˇajavec, I.S. Hunter et al. // *Food Technol. Biotechnol.* – 2005. – №43 –P. 9-17.
54. De Pascale, G. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions / G. De Pascale, G.D. Wright // *Chembiochem*– 2010. – V. 11 – №10 – P. 1325-1334.
55. Doi, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides / Y. Doi, Y. Arakawa // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – V. 45. – P. 88–94.
56. Eljaaly, K. Plazomicin: a novel aminoglycoside for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections / K. Eljaaly, A. Alharbi, S. Alshehri, J.K. Ortwine // *Drugs* – 2019. – V. 79 – P. 243-269 –doi: 10.1007/s40265-019-1054-3.
57. Epanand, R.M. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics / R.M. Epanand, C. Walker, R.F. Epanand, N.A. Magarvey // *BiochimBiophysActa.* – 2016. – V. 1858 – P. 980-987.
58. Fiedler, H.P. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites / H.P. Fiedler, C. Bruntner, A.T. Bull, A.C. Ward // *Antonie van Leeuwenhoek* – 2005.– V. 87 – P. 37-42.
59. Fong, D. Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry / D. Fong, A. Berghuis // *EMBO* – 2002. – V. 21 – P. 2323–2331.

60. Fong, D. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of 3'-aminoglycoside kinase type IIIa complexed with a eukaryotic protein kinase inhibitor, CKI-7 / D. Fong, A. Berghuis // *Acta Cryst.* – 2004. – V. 60 – P. 1897-1899.
61. Fong, D. Structural basis of APH(3'')-IIIa-mediated resistance to N1-substituted aminoglycoside antibiotics / D. Fong, A. Berghuis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – V. 53 – P. 3049-3055.
62. Fong, D. Structure of the antibiotic resistance factor spectinomycin phosphotransferase from *Legionella pneumophila* / D. Fong, C. Lemke, J. Hwang, B. Xiong et al. // *Biol. Chem.* – 2010. – V. 285 – P. 9545-9555.
63. Fong, D. Crystal structures of two aminoglycoside kinases bound with a eukaryotic protein kinase inhibitor / D. Fong, B. Xiong, J. Hwang, A. Berghuis // *PLoS ONE*, – 2011. – V. 6–issue 5 – e19589.
64. Forge, A. Aminoglycoside antibiotics / A. Forge, J. Schacht // *Audiol Neurootol*– 2000. – V.5– P. 3-22.
65. Fourmy, D. Structure of the A site of *Escherichia* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic / D. Fourmy, M. Recht, S. Blanchard, J. Puglisi // *Science* – 1996. – V. 27 – P. 1367-1374.
66. Frase, H. Revisiting the nucleotide and aminoglycoside substrate specificity of the bifunctional aminoglycoside acetyltransferase(6)-Ie/aminoglycoside phosphotransferase(2'')-Ia enzyme / H. Frase, M. Toth, S. Vakulenko // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287 – P. 43262-43269.
67. Galimand, M. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548 / M. Galimand, S. Sabtcheva, P. Courvalin, T. Lambert // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – V. 49 – P. 2949-2953.
68. Gao, F. Synthesis and structure-activity relationships of truncated bisubstrate inhibitors of aminoglycoside 69-N-acetyltransferases / F. Gao, X. Yan, T. Shakya, O.M. Baettig et al. // *J Med Chem*– 2006. – V. 49 – №17 – P. 5273-5281.
69. Ghai, I. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability / I. Ghai, S. Ghai // *Infect Drug Resist.* – 2018. – V. 11 – P. 523-530.
70. Gibson, M.K. Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome / M. K. Gibson, T. S. Crofts, G. Dantas // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2015. – V. 27. – P. 51-56.
71. Goyer, C. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Quebec, Canada / C. Goyer, E. Faucher, C. Beaulieu // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 1996. – V. 46 – P. 635-639.

72. Gravius, B. Genetic instability and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*. / B. Gravius, T. Bezmalinovic', D. Hranueli, J. Cullum // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59 – P. 2220-2228.
73. Gullón, S. The cellular mechanisms that ensure an efficient secretion in *Streptomyces* / S. Gullón, R.P. Mellado // Antibiotics – 2018.– V. 7 – №33 – P. 1-13. – doi:10.3390/antibiotics7020033.
74. Haddad, J. An antibiotic cloaked by its own resistance enzyme / J. Haddad, S.B. Vakulenko, S. Mobashery // J. Am. Chem. Soc. – 1999. – V. 121 – P. 11922–11923.
75. Hainrichson, M. Overexpression and initial characterization of the chromosomal aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase APH(3')-IIb from *Pseudomonas aeruginosa* / M. Hainrichson, O. Yaniv, M. Cherniavsky, I. Nudelman et al. // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – V. 51 – P. 774-776.
76. Hancock, R.E. Aminoglycoside uptake and mode of action with special reference to streptomycin and gentamicin I. Antagonists and mutants / R. E. Hancock // J. Antimicrob. Chemother. – 1981. – V. 8 – P. 249-276.
77. Hashimoto, Y. K. Importance of autophosphorylation at Ser186 in the A-loop of salt inducible kinase 1 for its sustained kinase activity / Y. K. Hashimoto, T. Satoh, M. Okamoto, H. J. Takemori // Cell. Biochem. –2008. – V. 104. – P. 1724-1739.
78. Heep, M. Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis* / M. Heep, U. Rieger, D. Beck, N. Lehn // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – V. 44 – P. 1075-1077.
79. Heinzl, P. A. Second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3"-phosphotransferase. Relationships between antibiotic and protein kinases / P. Heinzl, O. Werbitzky, J. Distler, W. Piepersberg // Arch Microbiol. – 1988. – V. 150. – № 2. – P. 184-192.
80. Hermann, T. Drugs targeting the ribosome / T. Hermann // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2005. – V. 15 – P. 355-366.
81. Hermann, T., Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches / T. Hermann // Cell. Mol. Life Sci. – 2007. – V. 64 – P. 1841-1852.
82. Hirano, S. Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus* / S. Hirano, K. Tanaka, Y. Ohnishi, S. Horinouchi // Microbiology. – 2008. – V. 154. – № 3. – P. 905-914. doi: 10.1099/mic.0.2007/014381-0.

83. Hon, W. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases / W. Hon, G. McKay, P. Thompson, R. Sweet et al. // *Cell* – 1997. – V. 89 – P. 887-895.
84. Hossion, A.M. Novel quercetin glycosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents / A. M. Hossion, K. Sasaki // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* – 2013. – V. 8. – №3. – P. 198-205.
85. Hotta, K. Kanamycin and its derivative, arbekacin: significance and impact / K. Hotta, S. Kondo // *J Antibiot. (Tokyo)* – 2018. – V. 71 – P. 417-424.
86. Houghton, J. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? / J. Houghton, K. Green, W. Chen, S. Garneau-Tsodikova // *Chembiochem.* – 2010. – V. 11 – P. 880-902.
87. Iino, D. Crystal structures of the ternary complex of APH(4)-Ia/Hph with hygromycin B and an ATP analog using a thermostable mutant / D. Iino, Y. Takakura, K. Fukano, Y. Sasaki et al. // *J. Struct Biol.* – 2013. – V. 183. – № 1. – P. 76-85. doi: 10.1016/j.jsb.2013.05.023.
88. Jana, S. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. / S. Jana, J. Deb // *Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – V. 70 – P. 140-150.
89. Jandhyala S.M. Role of the normal gut microbiota / S. M. Jandhyala, R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – V. 21. – № 29. – P. 8787-8803.
90. Jeong, H. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3) / H. Jeong et al. // *Mol. Biol.* – 2009. – V. 394. – P. 644-652.
91. Kaplan, E. Aminoglycoside binding and catalysis specificity of aminoglycoside 2"-phosphotransferase IVa: A thermodynamic, structural and kinetic study / E. Kaplan, J. F. Guichou, L. Chaloin, S. Kunzelmann et al. // *Biochim. Biophys Acta.* – 2016. – V. 1860. – № 4. – P. 802-813.
92. Karaman, M. Effects of imipenem, tobramycin and curcumin on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* strains / M. Karaman, F. Firinci, Z. Ayyildiz, I. Bahar // *Mikrobiyol Bul.* – 2013. – V. 47 – P. 192-194.
93. Kaul, M. Molecular determinants of antibiotic recognition and resistance by aminoglycoside phosphotransferase (3)-IIIa: a calorimetric and mutational analysis / M. Kaul, C. Barbieri, A. Srinivasan, D. Pilch // *Mol. Biol.* – 2007. – V. 369 – №1 – P. 142-156.
94. Kellermayer, R. Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations / R. Kellermayer // *European journal of medical genetics* – 2006. – V. 49 – P. 445-450.
95. Kemung, H. *Streptomyces* as a prominent resource of future anti-MRSA drugs / H. Kemung, L. Tan, T. Khan, K-G. Chan et al. // *Frontiers in Microbiology* – 2018. – V. 9 – P. 2221-2247.
96. Kim, S. Cloning, expression, purification, crystallization and X-ray crystallographic analysis of Rv3168 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv / S. Kim, C.M. Nguyen, S.J. Yeo, J.W. Ahn

- et al. // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. – 2011. – V. 67 – № 5. – P. 627-629. –doi: 10.1107/S1744309111010487.
97. Kim, C. Phosphoryl transfer by aminoglycoside 3'-phosphotransferases and manifestation of antibiotic resistance / C. Kim, S. Mobashery // Bioorganic Chemistry – 2005. – V. 33 – P. 149-158.
98. Kohl, A. Allosteric inhibition of aminoglycoside phosphotransferase by a designed ankyrin repeat protein / A. Kohl, P. Amstutz, P. Parizek, H. Binz et al. // Structure – 2005 – V. 13 – P. 1131-1141.
99. Kononen, E. Actinomyces and related organisms in human infections / E. Kononen, W.G. Wade // Clinical Microbiology Reviews – 2015. – V. 28 – №2 – P. 419-442.
100. Kotra, L. Aminoglycoside: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance / L. Kotra, J. Haddad, S. Mobashery // Antimicrob Agents Chemother. – 2000. – V. 44 – P. 3249-3256.
101. Kramer, J. Directed evolution of aminoglycoside phosphotransferase (3') type IIIa variants that inactivate amikacin but impose significant fitness costs / J. Kramer, I. Matsumura // PLoS ONE – 2013. – V. 8 – №10 – e76687.
102. Krause, K.M. Aminoglycosides: An Overview / K. M. Krause, A. W. Serio, T. R. Kane, L. E. Connolly // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2016. – V.6. – № 6. –pii: a027029. doi: 10.1101/cshperspect.a027029.
103. Krzywińska, S. Virulence and the presence of aminoglycoside resistance genes of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from clinical specimens / S. Krzywińska, E. Szczuka, K. Dudzińska, A. Kaznowski // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2015. – V. 107 – P. 857-868.
104. Kumar, A. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake / A. Kumar, H. Schweizer // Advanced Drug Delivery Reviews – 2005. – V. 57 – P. 1486-1513.
105. Labby, K. Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections / K. Labby, S. Garneau-Tsodikova // Future Med. Chem. – 2013. – V. 5 – №11 – P. 1285-1309.
106. Lallemand, P. Transient kinetics of aminoglycoside phosphotransferase (3')-IIIa reveals a potential drug target in the antibiotic resistance mechanism / P. Lallemand et al. // FEBS Lett. – 2012. – V. 586 – P. 4223-4227.
107. Lambert, P. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites / P. Lambert // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2005. – V. 57 – P. 1471-1485.

108. Leban, N. Kinetic characterization and molecular docking of novel allosteric inhibitors of aminoglycoside phosphotransferases / N. Leban, E. Kaplan, L. Chaloin, S. Godreuil et al. // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* – 2017. – V. 1861. – P. 3464-3473.
109. Li, D. Construction of a gentamicin C1a-overproducing strain of *Micromonospora purpurea* by inactivation of the *gacD* gene / D. Li, H. Li, X. Ni, H. Zhang et al. // *Microbiol Res.* – 2013. – V. 168. – №5. – P. 263-267.
110. Link, N. A collective form of cell death requires homeodomain interacting protein kinase / N. Link, P. Chen, W. J. Lu, K. Pogue et al. // *J. Cell Biol.* – 2007. – V. 178. – №4. – P. 567-574.
111. Liu, M. Tethered bisubstrate derivatives as probes for mechanism and as inhibitors of aminoglycoside 3'-phosphotransferases / M. Liu, J. Haddad, E. Azucena, L.P. Kotra et al. // *J. Org. Chem.* – 2000. – V. 65 – P. 7422-7431.
112. Loria, R. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces* / R. Loria, J. Kers, M Joshi // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2006. – V. 44 – P. 469-487.
113. MacLeod, D.L. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment / D.L. MacLeod, L.E. Nelson, R.M. Shawar, B.B Lin et al. // *J. Infect. Dis.* – 2000. – V. 181 – P. 1180-1184.
114. Magalhaes, M. Aminoglycosides: mechanism of action and resistance / M. Magalhaes, G. Blanchard // *Antimicrobial Drug Resistance, InfectiousDisease* – 2009. – P. 171-182.
115. Magnet, S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance / S. Magnet, J. Blanchard // *Chem. Rev.* – 2005. – V. 105 – P. 477-497.
116. Magnet, S. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454 / S. Magnet, P. Courvalin, T. Lambert // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – V. 45 – P. 3375-3380.
117. McArthur, A.G. The comprehensive antibiotic resistance database / A.G. McArthur, N. Waglechner, F. Nizam, A. Yan // *Antimicrob Agents Chemother* – 2013. – V. 57 – №7 – P. 3348-3357 – doi: 10.1128/AAC.00419-13.
118. Mehta, R. Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus* / R. Mehta, W.S. Champney // *Curr. Microbiol.* – 2003. – V. 47 – P. 237-243.
119. Menzies, D. Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis / D. Menzies, A. Benedetti, A. Paydar, I. Martin et al. // *PLoS Med.* – 2009. – V. 6. – e1000146.
120. Morar, M. The genomic enzymology of antibiotic resistance / M Morar, G. Wright // *Annu. Rev. Genet.* – 2010. – V. 44. – P. 25-51.

121. Motkova, M.O. Stability of the antibiotic formation trait of the tobramycin producer *Streptomyces cremeus* subsp. *Tobramycini* / M. O. Motkova, E. G. Gladkikh, T.P. Korobkova // Antibiotiki. – 1984. – V. 29. – № 2. – P. 83-85.
122. Nepal, K.K. Heterologous production of paromamine in *Streptomyces lividans* TK24 using kanamycin biosynthetic genes from *Streptomyces kanamyceticus* ATCC 12853 / K. K. Nepal, T. J. Oh, J. K. Sohng // Mol. Cells. – 2009. – V. 27. – № 5. – P. 601-608. doi: 10.1007/s10059-009-0080-5.
123. Newman, D.J. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years / D. J. Newman, G. M. Cragg // Journal of Natural Products. – 2007. – V. 70. – № 3. – P. 461–477.
124. Nurizzo D. The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance / D. Nurizzo, S. Shewry, M. Perlin, S. Brown et al. // Mol. Biol. – 2003. – V. 327. – P. 491–506.
125. O'Connor, M. Interaction between 16S ribosomal RNA and ribosomal protein S12: differential effects of paromomycin and streptomycin / M. O'Connor, E. A. De Stasio, A. E. Dahlberg // Biochimie. – 1991. – V. 73. – P. 1493–1500.
126. Ogawara, H. Self-resistance in *Streptomyces*, with Special Reference to β -Lactam Antibiotics / H. Ogawara // Molecules. – 2016. – V. 21. – № 5. – P. E605.
127. Ogle, J. M. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures / J.M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan // Trends Biochem. Sci. – 2003. – V. 28. – P. 259–266.
128. Ogle, J. M. Structural insights into translational fidelity / J. M. Ogle, V. Ramakrishnan // Annu. Rev. Biochem. – 2005. – V. 74. – P. 129–177.
129. Okazaki, A. Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia* / A. Okazaki, M. B. Avison // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – V. 51. – №1. – P. 359-360.
130. Ota, Y. Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans* / Y. Ota, H. Tamegai, F. Kudo, H. Kuriki et al. J Antibiot (Tokyo). – 2000. – V. 53. – № 10. – P. 1158-1167.
131. Over, U. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey / U. Over, D. Gur, S. Unal, G. H. Miller // Clin. Microbiol. Infect. – 2001. – V. 7. – P. 470–478.
132. Ozen, C. Detection of specific solvent rearrangement regions of an enzyme: NMR and ITC studies with aminoglycoside phosphotransferase(3')-IIIa / C. Ozen, A. Norris, M. Land, E. Tjioe E. et al. // Biochemistry. – 2008. – V. 47. – P. 40-49.
133. Park, D. H. Characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Korea / D.H. Park, Y. M. Yu, J. S. Kim, J. M. Cho et al. // Plant Dis. – 2003. – V. 87. – P. 1290-1299.

134. Parulekar, R. S. Antibiotic resistance and inhibition mechanism of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(5) from *B. subtilis* subsp. *subtilis* strain RK // R. S. Parulekar, S. S. Barale, K. D. Sonawane // *Braz. J. Microbiol.* – 2019. – [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s42770-019-00132-z.
135. Paulsen, I. T. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities / I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, M. H. Saier // *J. Mol. Biol.* – 1998. – V. 277. – P. 573–592.
136. Perry, J. A. The antibiotic resistome: what's new? / J. A. Perry, E. L. Westman, G. D. Wright // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2014. – V. 21. – P. 45-50.
137. Petković, H. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer / H. Petkovic, J. Cullum, D. Hranueli, I. S. Hunter et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – V. 70. – № 3. – P. 704-728.
138. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance / K. Poole // *Antimicrob. chemother.* – 2005. – V. 56. – P. 20–51.
139. Poulidakos, P. Aminoglycoside therapy in infectious diseases / P. Poulidakos, M. E. Falagas // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2013. – V. 14. – № 12. – P. 1585-1597
140. Ramirez, M. Aminoglycoside modifying enzymes / M. Ramirez, M. Tolmasky // *Drug Resistance Updates.* – 2010. – V. 13. – P. 151-171.
141. Ramirez M. S. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition / M. S. Ramirez, M. E. Tolmasky // *Molecules.* – 2017. – V. 22. – № 12. – P. E2267.
142. Ramón-García, S. Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum* / S. Ramón-García, I. Otal, C. Martín, R. Gómez-Lus et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2006. – V. 50. – № 11. – P. 3920-3922.
143. Ramos, J. L. The TetR family of transcriptional repressors / L. J. Ramos, M. Martínez-Bueno, A. J. Molina-Henares, W. Terán et al. // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2005. – V. 69. – № 2. – P. 326-356.
144. Recht, M. I. Aminoglycoside resistance with homogeneous and heterogeneous populations of antibiotic resistant ribosomes / M. I. Recht, J. D. Puglisi // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – V. 45. – P. 2414– 2419.
145. Ribeiro da Cunha, B. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? / B. Riberio de Cunha, L. P. Fonseca, C. R. Calado // *Antibiotics (Basel).* – 2019. – V. 8. – № 2. – P. E45.
146. Riccio, M. In 70 of plasmid pAX22, a bla (VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette / M. Riccio, L. Pallecchi, R. Fontana, G. Rossolini // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – V. 45. – P. 1249–1253.

147. Robichon, C. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography / C. Robicon, J. Luo, T. Causey, J. Benner // *Applied and environmental microbiology*. – 2011. – V. 77. – № 13. – P. 4634–4646.
148. Romero-Rodríguez, A. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces* / A. Romero-Rodríguez, I. Robledo-Casados, S. Sánchez // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – V. 1849. – № 8. – P. 1017-1039. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.06.007.
149. Rosenberg, E. Y. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump / E. Y. Rosenberg, D. Ma, H. Nikaido // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182. – P. 1754–1756.
150. Rybak, L. Ototoxicity: therapeutic opportunities / L. Rybak, C. Whitworth // *Drug Discov. Today*. – 2005. – V. 10. – P. 1313 – 1321.
151. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – P. 479.
152. Sánchez-Carrera, D. Fludarabine resistance mediated by aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa and the structurally related eukaryotic cAMP-dependent protein kinase / D. Sanchez-Carrera, S. Bravo-Navas, E. Cabezón, I. Arechaga I. // *FASEB J.* – 2017. – V. 31. – № 7. – P. 3007-3017
153. Sanger, F. DNA sequencing chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Biotechnology*. – 1992. – V. 24 – P. 104-108.
154. Schlatter, D.C. Do tradeoffs structure antibiotic inhibition, resistance, and resource use among soil-borne *Streptomyces*? / D.C. Schlatter, L.L. Kinkel // *BMC EvolBiol.* – 2015. – V. 15. – P. 186-190.
155. Scheeff, E.D. Structural evolution of the protein kinase-like superfamily / E.D. Scheeff, P.E. Bourne // *PLoS comput. Biol.* – 2005. – V. 1 – №5 – P. 49-56.
156. Scholz, P. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010 / P. Scholz, V. Haring, B. Wittmann-Liebold, K. Ashman et al. // *Gene*. – 1989. – V. 75 – №2. – P. 271-288.
157. Seipke, R.F. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? / R. F. Seipke, M. Kaltenpoth, M. I. Hutchings // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2012. – V. 36. – P. 862-876.
158. Selimoglu, E., 2007. Aminoglycoside-induced ototoxicity / E. Selimoglu // *Current Pharmaceutical Design*. – 2007. – V. 13. – P. 119-126.
159. Serio, A.W. Plazomicin is active against metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* / A. W. Serio, T. Keepers, K. M. Krause // *Open Forum Infect. Dis.* – 2019. – V. 6. – № 4. – ofz123. doi: 10.1093/ofid/ofz123.

160. Serio, A. Aminoglycosides: Mechanisms of action and resistance / A. Serio, M. Magalães, J. S. Blanchard, L. Connolly // In Antimicrobial Drug Resistance. – Springer: Cham. – 2017. – P. 130.
161. Shaeer, K. M. Plazomicin: a next-generation aminoglycoside / K. M. Shaeer, M. T. Zmarlicka, E. B. Chahine, N. Piccicacco // Pharmacotherapy. – 2019. – V. 39. – № 1. – P. 77-93.
162. Shakya, T. Nucleotide selectivity of antibiotic kinases / T. Shakya, G. Wright // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – V. 54. – P. 1909–1913.
163. Shakya, T. A. Small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome / T. A. Shakya, P. Stogios, N. Waglechner, E. Evdokimova et al. // Chemistry and Biology. – 2011. – V. 18. – P. 1591–1601.
164. Shaw, K. J. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycosidemodifying enzymes / K. J. Shaw, P. N. Rather, R. S. Hare, G. H. Miller // Microbiol Rev. – 1993. – V. 57. – № 1. – P. 138-163.
165. Shevchenko, A. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes / A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen et al. // Nat. Protoc. – 2006. – №1 – P. 2856-2860.
166. Shi, K. Structural basis for dual nucleotide selectivity of aminoglycoside 2''-phosphotransferase IVa provides insight on determinants of nucleotide specificity of aminoglycoside kinases / K. Shi, A. Berghuis // Biol. Chem. – 2012. – V. 287. – P. 13094–13102.
167. Shi, K. Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance / K. Shi, S. Caldwell, D. Fong, A. Berghuis // Front Cell Infect. Microbiol. – 2013. – V. 3. – №22. – P. 1-17.
168. Silva, J. New insights into aminoglycoside antibiotics and derivatives / J. Silva, I. Carvalho // Curr. Med. Chem. – 2007. – V. 14 – P. 1101-1119.
169. Siregar, G. Purification and characterization of aminoglycoside-3'-phosphotransferase type IIa and kinetic comparison with a new mutant enzyme / G. Siregar, S. Lerner, S. Mobashery // Antimicrobial agents and chemotherapy – 1994. – V. 38 – №4 – P. 641-647.
170. Siti, J.A. Discovery of antimalarial drugs from *Streptomyces* metabolites using a metabolomic approach / J.A. Siti, B. Mohd, N.B. Syarul, S.B. Mohd et al. // Journal of Tropical Medicine – 2017. – V. 2017 – P. 1-7 – <https://doi.org/10.1155/2017/2189814>.
171. Sizova, I. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii* / I. Sizova, M. Fuhrmann, P.A. Hegemann // Gene – 2001 – V. 277 – P. 221-229.

172. Sizova, I.A. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker / I.A. Sizova, T.V. Lapina, O.N. Frolova, N.N. Alexandrova et al. // *Gene* – 1996. – V. 181 – P. 13-18.
173. Smith, C.A. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation / C.A. Smith, E.N. Baker // *Curr Drug Targets Infect Disord.* – 2002. – V. 2 – P. 143-160.
174. Smith, C. Aminoglycoside- 2'' phosphotransferase-IIIa (APH(2'')-IIIa) prefers GTP over ATP: structural templates for nucleotide recognition in the bacterial aminoglycoside-2'' kinases / C. Smith, M. Toth, H. Frase, L. Byrnes et al. // *Biol.Chem.* – 2012. – V. 287 – P. 12893-12903.
175. Steiniger-White, M. Structure/function insights into Tn5 transposition / M. Steiniger-White, I. Rayment, W.S. Reznikoff // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2004. – V. 14 – P. 50-57.
176. Stogios, P. Structure-guided optimization of protein kinase inhibitors reverses aminoglycoside antibiotic resistance / Stogios P. et al. // *Biochem.* – 2013. – V. 454 – P. 191-200.
177. Stogios, P. Structure and function of APH(4)-Ia, a hygromycin B resistance enzyme / P. Stogios, T. Shakya, E. Evdokimova, A. Savchenko et al. // *Biol. Chem.* – 2011. – V. 286 – P. 1966–1975.
178. Sutcliffe, J. Improving on nature: antibiotics that target the ribosome / J. Sutcliffe // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2005. – V. 8 – P. 534-542.
179. Taber, H.W. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics / H.W. Taber, J.P. Mueller, P.F. Miller, A.S. Arrow // *Microbiol. Rev.* – 1987. – V. 51 – P. 439-457.
180. Takahashi, Y. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics / Y. Takahashi, T. Nakashima // *Antibiotics* – 2018. – V. 7 – №45 – P. 45. doi:10.3390/antibiotics7020045.
181. Takenoya, M. Structural basis for the substrate recognition of aminoglycoside 7''-phosphotransferase-Ia from *Streptomyces hygroscopicus* // M. Takenoya, T. Shimamura, R. Yamanaka, Y. Adachi et al // *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* –2019. – V. 75. – № 9. –P. 599 - 607. doi: 10.1107/S2053230X19011105.
182. Tao, W. CRISPR/Cas9-based editing of *Streptomyces* for discovery, characterization, and production of natural products / W. Tao, A. Yang, Z. Deng, Y. Sun // *Frontiers in Microbiology* – 2014. – V. 9 – P. 1660-1668.
183. Thapa, L.P. Biosynthesis of spectinomycin: heterologous production of spectinomycin and spectinamine in an aminoglycoside-deficient host, *Streptomyces venezuelae* YJ003 / L. P. Thapa, T. J. Oh, K. Luou, J. K. Sohng // *J. Appl. Microbiol.* – 2008. – V. 105. – №1. – P. 300-308.
184. Tauch, A. The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil

- bacteria and in plant, animal, and human pathogens. / A. Tauch, K. Kalinowski, A. Puhler // Mol. Gen. Genet. – 2000. – V. 263 – P. 1-11.
185. Therrien, C. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions / C. Therrien, R.C. Levesque // FEMS Microbiol Rev – 2000. – V. 24 – №3 – P. 251-262.
186. Tolmasky, M.E. Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination / M. E. Tolmasky // ASM Press. – Washington DC. – 2007. – P. 35–52.
187. Tomihama, T. Draft genome sequences of *Streptomyces scabiei* S58, *Streptomyces turgidiscabies* T45, and *Streptomyces acidiscabies* a10, the pathogens of potato common scab, isolated in Japan / T. Tomihama, Y. Nishi, M. Sakai, M. Ikenaga et al. // Genome Announc – 2016. – V. 4 – e00062-16.
188. Toth, M. Source of phosphate in the enzymic reaction as a point of distinction among aminoglycoside 2''-phosphotransferases / M. Toth, J. Chow, S. Mobashery, S. Vakulenko // Biol. Chem. – 2009. – V. 284 – P. 6690-6696.
189. Toth, M. Crystal structure and kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase-2''-IVa / M. Toth, H. Frase, N. Antunes, C. Smith et al. // Protein Sci. – 2010. – V. 19 – P. 1565-1576.
190. Trower, M.K. PCR cloning of a streptomycin phosphotransferase (aphE) gene from *Streptomyces griseus* ATCC 12475 / M.K. Trower, K.G. Clark // Nucleic. Acids. Res. – 1990. – V. 18 – №15 – P. 4615.
191. Vakulenko, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future / S. Vakulenko, S. Mobashery // Clinical microbiology reviews – 2003. – V. 16 – №3 – P. 430-450.
192. Venkataraman, N. Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1 / N. Venkataraman, A. Cole, P. Ruchala, A. Waring et al. // PLoS Biol. – 2009. – V. 7 – e1000095.
193. Veyssier, P., 2005. Aminocyclitol aminoglycosides / P. Veyssier, A. Bryskier // In: Bryskier A., Antimicrobial Agents. – ASM Press. – Washington, DC. – P. 453–469.
194. Vicens, Q. Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of x-ray crystal structures / Q. Vicens, E. Westhof // Biopolymers – 2003. – V. 70 – P. 42-57.
195. Waksman, S.A. The *Actinomycetes* and their antibiotics / S.A. Waksman // Adv. Appl. Microbiol. – 1963. – V. 5. – P. 235-315.
196. Walmsley, M. The structure and function of drug pumps / M. Walmsley // Trends Microbiol – 2001. – V. 9 – P. 71-79.

197. Welch, K.T. Discovery of non-carbohydrate inhibitors of aminoglycoside-modifying enzymes / K.T. Welch, K.G. Virga, N.A. Whittemore, C. Ozen et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2005. – V. 13 – P. 6252-6263.
198. Wieninger, S. ATP binding enables broad antibiotic selectivity of aminoglycoside phosphotransferase(3)-IIIa: an elastic network analysis / S. Wieninger, E. Serpersu, G. Ullmann // *Mol. Biol.* – 2011. – V. 409 – P. 450-465.
199. Willmott, C.J. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase–DNA complex / C.J. Willmott, A. Maxwell // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1993. – V. 37 – P. 126-127.
200. Wilson, D. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance / D. Wilson // *Nature reviews (Microbiology)* – 2014. – V. 12 – P. 35-48.
201. Woodcock, D.M. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants / D.M. Woodcock, P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17 – P. 3469-3478.
202. Wooldridge, M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals / M. Wooldridge // *Rev Sci Tech.* – 2012. – V.31 – №1 – P. 231-247.
203. Wright, G.D. Environmental and clinical antibiotic resistomes, same only different / G. D. Wright // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2019. – V. 51. – P. 57-63.
204. Wright, G.D. Aminoglycoside-modifying enzymes / G. Wright // *Current Opinion in Microbiology* – 1999. – V. 2 – P. 499-503.
205. Wright, G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity / G.D. Wright // *Nature reviews microbiology* – 2007. – V. 5 – P. 175-186.
206. Wright, G.D. The antibiotic resistome / G.D. Wright // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2010. – V. 5 – №8 – P. 779-788.
207. Wright, G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance / G.D. Wright // *ChemCommun.* – 2011. – V. 47 – №14 – P. 4055-4061.
208. Wright, G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification / G. Wright // *Advanced drug delivery reviews* – 2005. – V. 57 – P. 1451-1470.
209. Wright, G., Aminoglycoside antibiotics: structures, functions, and resistance / G. Wright, A. Berghuis, S. Mobashery // In: *Resolving the antibiotic paradox.* – Plenum Publishers. – New York. – 1998. – P. 27 - 69.
210. Wright, G. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery / G. Wright, H. Poinar // *Trends in Microbiology* – 2012. – V. 20 – №4 – P. 157-159.

211. Wright, G.D. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism / G.D. Wright, P.R. Thompson // *Front. Biosci.* – 1999. – V. 4 – P. D9–21.
212. Wu, L. Deciphering interactions of the aminoglycoside phosphotransferase(3')-IIIa with its ligands./ L.Wu, E. Serpersu // *Biopolymers* – 2009. – V. 91 – №9 – P. 801-809.
213. Yang, L. Development of aminoglycoside antibiotics effective against resistant bacterial strains / L. Yang, X.-S. Ye // *Current Topics in Medicinal Chemistry* – 2010. – V. 10 – №18. – P. 1898-1926.
214. Yao J. Antibacterial agents / J. Yao, R. Moellering // In: *Manual of Clinical Microbiology.* – American Society for Microbiology Press. – Washington DC. –2007. – P. 1077-1113.
215. Young, P. The crystal structures of substrate and nucleotide complexes of *Enterococcus faecium* aminoglycoside-2''-phosphotransferase-IIa [APH(2'')-IIa] provide insights into substrate selectivity in the APH(2'') subfamily / P. Young, R. Walanj, V. Lakshmi, L. Byrnes et al. // *Bacteriol.* – 2009. – V. 191 – P. 4133-4143.
216. Zaher, H.S. Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis / H.S. Zaher, R. Green // *Cell* – 2009. – V. 136 – P. 746-762.
217. Zalacain, M. Purification and characterization of a hygromycin B phosphotransferase from *Streptomyces hygroscopicus* / M. Zalacain, J.M. Pardo, A. Jiménez // *Eur. J. Biochem.* –1987. – V. 162 – P. 419-422.
218. Zárate, S.G. Overcoming aminoglycoside enzymatic resistance: design of novel antibiotics and inhibitors / S.G. Zárate, M.L. De la Cruz Claire, R. Benito-Arenas, J. Revuelta et al. // *Molecules* – 2018. – V. 23 – №E284. – doi: 10.3390/molecules23020284.
219. Zhang, W. The bifunctional enzymes of antibiotic resistance / W. Zhang, J. Fisher, S. Mobashery // *Current Opinion in Microbiology* – 2009. – V. 12 – P. 505-511.
220. Zhang, Y. emergence of novel pathogenic *Streptomyces* species by site-specific accretion and cis-mobilization of pathogenicity islands / Y. Zhang, R. Loria // *Molecular Plant-Microbe Interactions* – 2017. – V. 30 – №1 – P. 72-82.
221. Zhukova, Yu. Pim family of protein kinases: structure, functions, and roles in Hematopoietic Malignancies / Yu. Zhukova, M. Alekseeva, N. Zakharevich, A. Shtil et al. // *Molecular Biology* – 2011. – V. 45 – №5 – P. 695–703.
222. Zingman, L. Aminoglycoside-induced translational readthrough in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy / L. Zingman, S. Park, T. Olson, A. Alekseev et al. // *Clin. pharmacol. and ther.* – 2007. – V. 81 – P. 99-103.
223. Zeng, L. *aph(3')-IIb*, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA / L. Zeng, S. Jin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – V. 47 – P. 3867-3876.

224. Vastrad, B. M. Optimization of medium composition for the production of neomycin by *Streptomyces fradiae* NCIM 2418 in solid state fermentation / B. M. Vastrad, S. E. Neelagund // Biotechnol Res Int. – 2014. – V. 2014. – P. 1-11. doi: 10.1155/2014/674286.
225. Vetting, M.W. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases / M.W. Vetting, S.d.C. Lp, M. Yu, S.S. Hegde et al. // Arch Biochem. Biophys. – 2005. – V. 433 – P. 212-226.

Приложение 1.

Паспорт гена аминогликозидфосфотрансферазы *aphSR3* штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC10970 и кодируемого им белка

Техническая информация

1. **Наименование организации и лаборатории:** Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Лаборатория генетики микроорганизмов
2. **Исполнитель:** Рудакова Н. Н.
3. **Дата составления документа:** 15.04.2015
4. **Название документа:** Паспорт гена аминогликозидфосфотрансферазы *aphSR3* штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC10970 и кодируемого им белка
5. **Литературные ссылки:**

Pethick F.E., MacFadyen A.C., Tang Z., Sangal V., Liu T.-T., Chu J., Kosec G., Peltkovic H., Guo M., Kirby R., Hoskisson P.A., Herron P.R. and Hunter I.S. Draft genome sequence of the oxytetracycline-producing bacterium *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. // Genome Announc., 2013, V. 1, №2, E00063-13.

Основные разделы

I. Описание гена

1. **Название гена:** ген аминогликозидфосфотрансферазы; ELQ83814.1, locus_tag="SRIM_08058" (contig00017)
2. **Происхождение:** *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970
3. **Нуклеотидная последовательность:** 819 п.н.

```
GTGATCGATCTGACCGCATTTCCTTACGCTGCTGCGCGCCGATGGCGGGGACGCCGGCTGG
GAGCCCGTGACGGACGGCGAGTCCGGGGCCGCGTCTTCCGCTCGGCCGACGGTTCGCGC
TACGCCAAGTGCGTGCCCCGCCGACCAGGTCGCCGCTTTGGAGGCGGAGCGGGACCGGGTG
AGCTGGCTGAGTACGCAGGACATTCGCCGGGCCGCGCGTCTCGACTGGCGCGTTCGGTGCC
GCCGGGGCCGGGCTGCTGACCAGCACCGTTCGAAGGGATTCCCGCCGACCGGGCGTTCGGCC
TCGATGCTGCGGGCGGGCGTGGGAGCCGATCGCGGACGCCGTGCGGCGGTTGCACGAACTG
CCACCGGAGAAGTGCCCGTTCACGCGCGAACTCGGCGAAATGTTCTCCATGGCCCGGGAT
GTCGTGCGCGGGGAAGCGGTCAATCCGGACTTCCTGCCCGAAGAGCAGCGGCACACGCCG
CCCGGCGAACTGCTCGCGCGCCTCGCCCCGTACGTCGGGCAGCGCCTCGCGCAGGAAGCC
```

GCGCAGACCGTCGTCTGCCACGGGGACCTGTGCCTGCCCAACATCATCCTCGATCCGGAC
 ACGCTGGACGTGGCGGGCTTCATCGACCTCGGCCGCTGGGACGCGCCGATCCCTACGCC
 GACCTCGCACTGCTCTTCGCCACCGCCCGGAGACGTGGGGCGACGACGAGCGGTGGTCA
 CAGTCGGCCGAAGAGGAGTTCGCCGCCGGTACGGAATCGCCCTCGACCGGGACCGCGAG
 CGGTTCTATCTGCATCTCGACCCCTGACCTGGGGATGA

4. Локализация гена и его окружение:

Название гена и кодируемого им белка	Идентификатор из GenBank	Locus_tag	Позиции начала и конца в хромосоме или плазмиде
Оксигеназа	ELQ83804.1	SRIM_08008	12109 - 13098
Гипотетический белок	ELQ83805.1	SRIM_08013	13681 - 14310
Белок ET79	ELQ83806.1	SRIM_08018	14544 - 15044
Гипотетический белок	ELQ83807.1	<u>SRIM_08023</u>	15091 - 17799
Белок ET79	ELQ83808.1	SRIM_08028	18168 - 19100
Гипотетический белок	ELQ83809.1	<u>SRIM_08033</u>	19178 - 19702
Транскрипционный регулятор семейства LysR	ELQ83810.1	SRIM_08038	19717 - 20586
β-лактамаза	ELQ83811.1	SRIM_08043	20699 - 21673
RimK белок	ELQ83812.1	SRIM_08048	21806 - 22834
RimK белок	ELQ83813.1	SRIM_08053	22831 - 23646
Аминогликозид фосфотрансфераза	ELQ83814.1	SRIM_08058	23654 - 24472
Регуляторный белок TetR	ELQ83815.1	SRIM_08063	24583 – 25257
Монооксигеназа FAD	ELQ83816.1	SRIM_08068	25308 – 26453
Гипотетический белок	ELQ83817.1	<u>SRIM_08073</u>	26473 – 27633
Транскрипционный регулятор семейства TetR	ELQ83818.1	SRIM_08078	27718 – 28287
Гипотетический белок	ELQ83819.1	<u>SRIM_08083</u>	28757 – 31375
Транспортный белок	ELQ83820.1	SRIM_08088	31912 – 33141
GTP гидролаза	ELQ83821.1	SRIM_08093	33235 – 33432
Гипотетический белок	ELQ83822.1	<u>SRIM_08098</u>	33611 – 33763
Белок семейства SAM	ELQ83823.1	SRIM_08103	33763 – 34497
Гипотетический белок	ELQ83824.1	SRIM_08108	34494 – 35312

Ген *aph(3'')-Id* находится в активном кластере генов, кодирующих регуляторные белки, связанные с устойчивостью к антибиотикам разных классов, стрессовым ответом и метаболизмом.

5. Межгенное пространство:

GCCNCCACCGTAACGAACATGTTTCGTTACGAACAAGTTCGTTTCAGCTCTCCTTTTCAGCACG
CGGTAAAATCGCGGTGCGGCGCGCGGGGCGCACTGGCTAGGTTGGCGACCGTG

Промотор типа А

II. Описание белка

1. **Название белка:** аминогликозидфосфотрансфераза; ELQ83814.1

2. **Белковая последовательность:** 272 остатков, 29,812 кДа

MIDLTAFLTLLRADGGDAGWEPVTDGESGAAVFRSADGSRYAKCVPADQVAALEAERDRVSWLSTQ
DIPGPRVLDWRVGAAGAGLLTSTVEGIPADRASMLRAAWEPIADAVRRLHELPPEKCPFTRELGEM
FSMARDVVAREAVNPDFLPEEQRHTPPGELLARLAPYVGQRLAQEAAQTVVCHGDLCLPNILDPDTL
DVAGFIDLGRGLGRADPYADLALLFATARETWGDDERWSQSAEEEEFAARYGIALDRDRERFYLHLDPLT
WG

3. **Изоэлектрическая точка:** 4,56

4. **Доменная структура белка:**

Регион "APH, Aminoglycoside 3'-phosphotransferase; cd05150" – 18 -270 а/к;

Регион "APH, Phosphotransferase enzyme family; pfam01636" – 20 -263 а/к;

"Active site" - 23, 25-27, 32, 41, 43, 71, 87-90, 94, 150-154, 189, 193-194, 196, 208-209, 227-228, 231, 267-268, 270 а/к

"ATP binding site [chemical binding]" – 23, 27, 32, 41, 43, 87-90, 94, 193-194, 196, 208-209 а/к

"Antibiotic binding site [chemical binding]" – 150-154, 189, 227-228, 231, 267-268, 270 а/к

5. **Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:**

По Программе NetPhos 3.1

39 S	0.866	unsp	0.764	PKC	0.520	DNAPK
61 S	0.988	unsp	0.611	PKC	0.522	PKA

64 S	0.986	unsp	0.544	PKC		
99 S	0.984	unsp	0.758	PKA	0.505	PKG
159 T	0.828	unsp	0.566	p38MAPK		
219 Y	0.983	unsp				
228 T	0.845	unsp	0.878	unsp		
240 S	0.993	unsp	0.637	DNAPK	0.589	CKII 0.531 ATM
242 S	0.989	unsp	0.661	CKII	0.507	cdc2

По Программе NetPhos 2.0 с вероятностью более 90%:

S₆₁ - 98,8 %

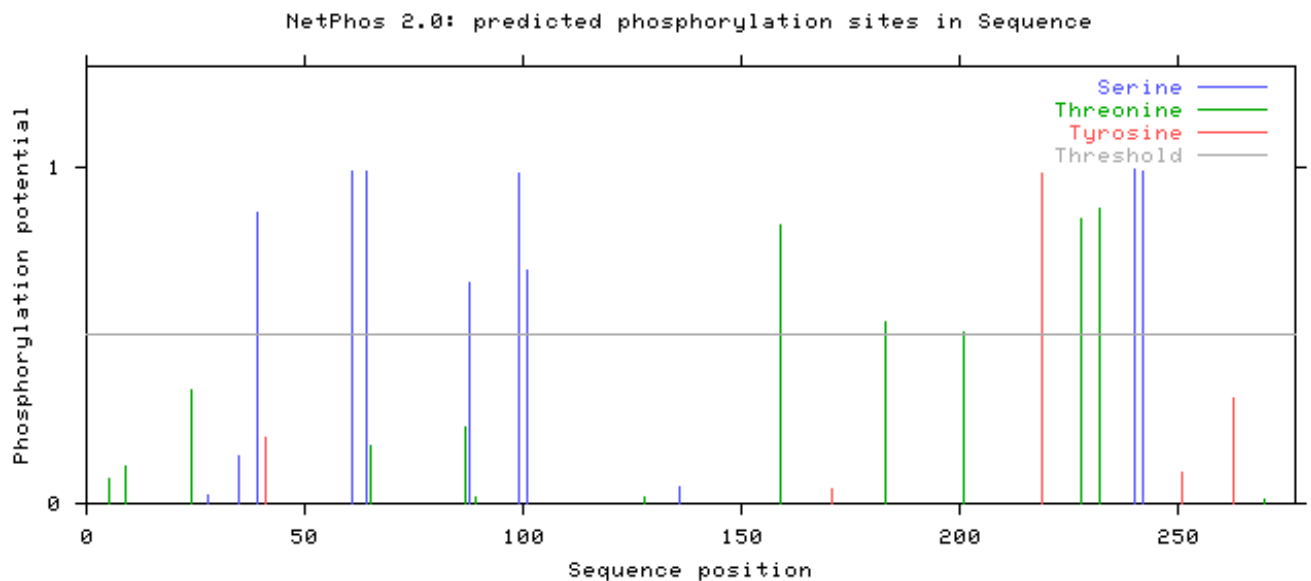
S₆₄ - 98,6 %

S₉₉ - 98,4 %

S₂₄₀ - 99,3 %

S₂₄₂ - 98,9 %

Tyr₂₁₉ - 98,3 %



По Программе NetPhosK 1.0

с вероятностью более 70% -

S₃₉ - PKC (76%)

S₉₉ - PKA (76%)

T₁₃₈ - PKC (72%)

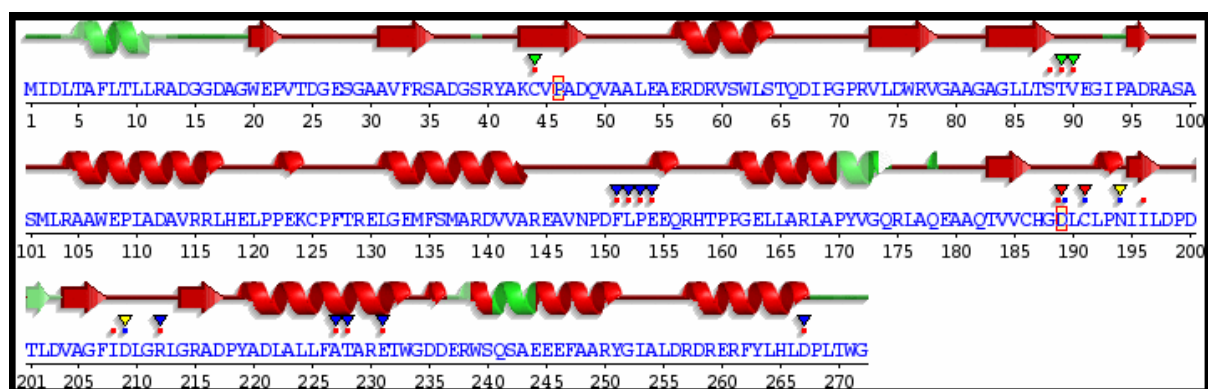
По Программе NetPhosVac 1.0

с вероятностью более 70 % -

Нет

6. Предсказание вторичной структуры белка:

по программе Sequence annotated by structure (SAS)



7. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:

отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка (выравнивания)	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
39,4	254 a/a	Кристаллическая структура аминогликозид-3 ¹ -фосфотрансферазы IIa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1nd4
28,1	249 a/a	Кристаллическая структура аминогликозид-3 ¹⁵ ''-фосфотрансферазы IIIa апофермента	<i>Enterococcus faecalis</i>	1j7i

8. Гомология с подобными генами штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970:

№	Название белка	% идентичности	% сходства	Ссылка на GenBank	locus_tag
1	Аминогликозид-фосфотрансфераза	36%	49%	ELQ83470.1	SRIM_10156
2	Гипотетический белок	27%	31%	ELQ79867.1	SRIM_28171
3	Гипотетический белок	30%	39%	ELQ77609.1	SRIM_39853

9. Гомология с подобными генами других видов и родов:

№	Название белка	Название штамма	% идентичности	% сходства	Ссылка на UniProt, GenBank
1	3'-киназа	<i>Streptomyces sp. AcH</i> 505	73%	82%	KIF69288.1
2	Гипотетический белок (аминогликозид-3'-фосфотрансфераза)	<i>Streptomyces niveus</i> NCIMB 11891	71%	80%	EST23296.1
3	3'-киназа	<i>Streptomyces wadayamensis</i>	65%	73%	KDR61083.1
4	Стрептомицин-6-фосфотрансфераза	<i>Streptomyces griseus</i>	66%	75%	AAA26815.1
5	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза	<i>Streptomyces griseus</i>	66%	75%	AAA26700.1
6	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза	<i>Streptomyces rimosus</i> <i>subsp. Paromycinus</i>	42%	52%	CAG44623.1
7	аминогликозид-3'-фосфотрансфераза	<i>Streptomyces fradiae</i>	39%	49%	AAA26699.1
8	аминогликозид-фосфотрансфераза	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	40%	51%	CAG34724.1

10. Возможные функции: фосфорилирование аминогликозидных антибиотиков по сайту инактивации 3'/3"/6

Приложение 2.

Паспорт гена аминогликозидфосфотрансферазы *aphSR2* штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC10970 и кодируемого им белка

Техническая информация

- 1. Наименование организации и лаборатории:** Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Лаборатория генетики микроорганизмов
- 2. Исполнитель:** Рудакова Н. Н.
- 3. Дата составления документа:** 7.07.2016
- 4. Название документа:** Паспорт гена аминогликозидфосфотрансферазы *aphSR2* штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 и кодируемого им белка
- 5. Литературные ссылки:**

Pethick F.E., MacFadyen A.C., Tang Z., Sangal V., Liu T.-T., Chu J., Kosec G., Peltkovic H., Guo M., Kirby R., Hoskisson P.A., Herron P.R. and Hunter I.S. Draft genome sequence of the oxytetracycline-producing bacterium *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. // Genome Announc., 2013, V. 1, №2, E00063-13.

Основные разделы

I. Описание гена

- 1. Название гена:** ген аминогликозидфосфотрансферазы; GI:440620851, ELQ83874.1, locus_tag="SRIM_07573" (contig00016)
- 2. Происхождение:** *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970
- 3. Способ получения:** амплификация с хромосомной ДНК
- 4. Клонирование и экспрессия в *E. coli*:** в составе мультикопийного вектора pET16b под контроль транскрипционного и трансляционного сигналов бактериофага T7 в рамке считывания под His-Tag с *atg* экспрессионного участка по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI. Полученной плазмидой трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий индуцибельный ген РНК-полимеразы бактериофага T7

Дегидрогеназа субъединица E2	ELQ83879.1	SRIM_07598	14336-15769
Белок семейства MutT	ELQ83880.1	SRIM_07603	16261-17046
Гипотетический белок	ELQ83881.1	SRIM_07608	17009-17449

II. Описание белка

1. Название белка: аминокликозидфосфотрансфераза; ELQ83874.1

2. Белковая последовательность: 346 остатков, 38.147 кДа

MLRSSDVRTAAPPDGHTLGSLLRRYGAGEPLSCVPVAEGLLNHGYRLATTHGRYFLKHHLDGDQAAI
ARQHRATRRLGALGLPVAPPLADADGRTVTVLGGRCYALHPWVEGRHRDGAALTRHQSRCLGALLG
QVHTALEQVITPDTAGPGVPYEHAGADPARTFEMIDELLALARRSRPRSSFDELAEHRLLEALLERE
AHRPPGADRVPATGWVHGDFHPLNLLYRDAEPAAIWDRLAVQPRAEEAVRAAAIFFVQPAGTLDL
PKVGAYAGAYRRASGAGAAELAAAVHRVWVERLNDFWMLDWRYRLGDRRADPQFPAAAALAVW
WTREYGAVRAAFTE

3. Изоэлектрическая точка: 9,09

4. Доменная структура белка:

Регион "PKc_like", Protein Kinases, catalytic domain; cl21453 – 16 - 241 а/к;

Регион "APH", Phosphotransferase enzyme family; pfam01636" – 32 - 245 а/к;

Сайт связывания АТФ – 36-39,42,44,55,57,85,107-110,221,225-226,228,238-239

5. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1

с вероятностью более 90% -

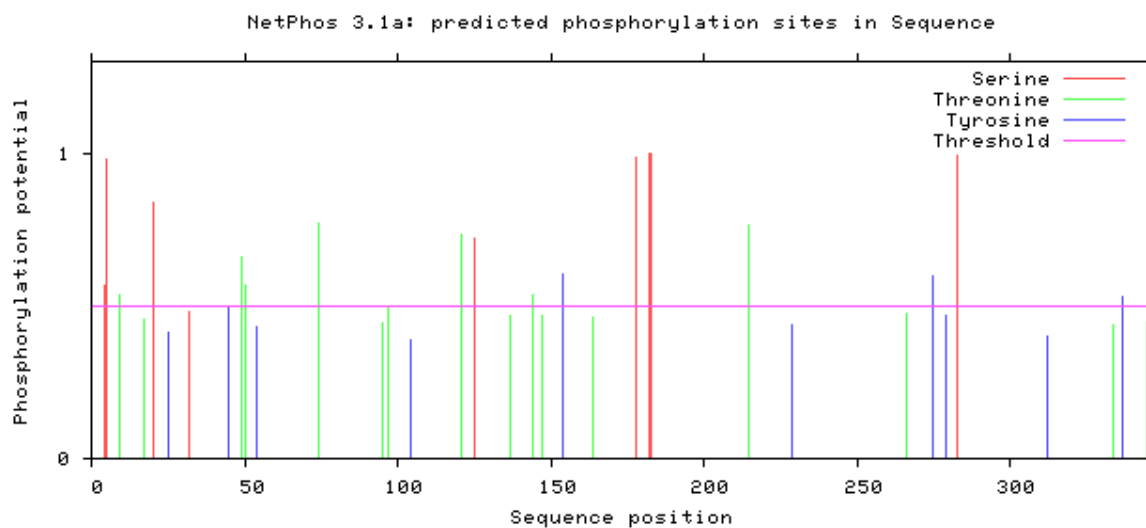
S₅ - 98,2 %

S₁₇₈ – 98,4 %

S₁₈₂ – 99,8 %

S₁₈₃ – 99,6 %

S₂₈₃ – 99,5 %



По Программе NetPhosVac 1.0

С вероятностью более 70 % -

Нет

6. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:

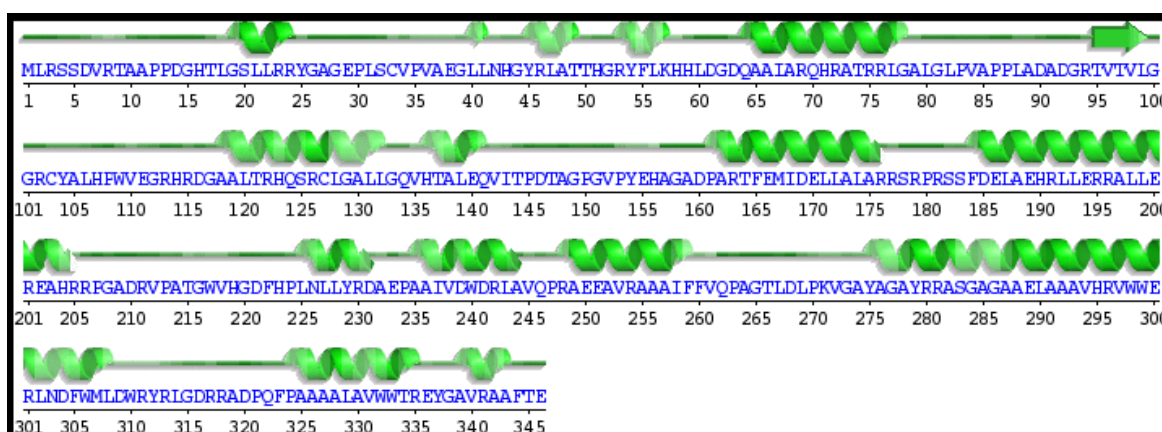
отсутствует.

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка (выравнивания)	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
31,2	125 a/a	Кристаллическая структура rv3168 (трансфераза)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3ats
29,8	181 a/a	Белок связанный с олигопептидом биосинтеза клавулановой кислоты	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	2wol
22,7	150 a/a	Кристаллическая структура спектиномицин фосфотрансферазы, aph(9)-Ia	<i>Legionella pneumophila</i>	3i1a

7. Предсказание вторичной структуры белка:

по программе Sequences Annotated by Structure (SAS):



8. Гомология с подобными генами других видов и родов:

№	Название белка	Название штамма	% идентичности	% сходства	Ссылка на UniProt, GenBank
1	Аминогликозид фосфотрансфераза	<i>Streptomyces sp.</i> NRRL WC-3701	99	100	GI:925295089
2	Аминогликозид фосфотрансфераза	<i>Streptomyces sp.</i> NRRL F-5755	99	98	GI:926368428
3	Аминогликозид фосфотрансфераза	<i>Streptomyces sp.</i> NRRL WC-3773	93	93	GI:664491753
4	Аминогликозид фосфотрансфераза	<i>Streptomyces monomycini</i>	92	93	GI:662051527
5	Аминогликозид фосфотрансфераза	<i>Streptomyces sp.</i> 769	78	81	GI:746608739
6	Аминогликозид фосфотрансфераза	<i>Streptomyces sp.</i> NRRL S-337	81	84	GI:664272704

9. Возможные функции: Фосфорилирование аминогликозидных антибиотиков

Приложение 3.**Паспорт гена аминогликозидацетилтрансферазы *aacSR* штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC10970 и кодируемого им белка**Техническая информация

- 1. Наименование организации и лаборатории:** Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Лаборатория генетики микроорганизмов
- 2. Исполнитель:** Рудакова Н. Н.
- 3. Дата составления документа:** 12.08.2019
- 4. Название документа:** Паспорт гена аминогликозидацетилтрансферазы *aacSR* штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC10970 и кодируемого им белка
- 5. Литературные ссылки:**

Pethick F.E., MacFadyen A.C., Tang Z., Sangal V., Liu T.-T., Chu J., Kosec G., Peltkovic H., Guo M., Kirby R., Hoskisson P.A., Herron P.R. and Hunter I.S. Draft genome sequence of the oxytetracycline-producing bacterium *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. // Genome Announc., 2013, V. 1, №2, E00063-13.

Основные разделы**I. Описание гена**

- 7. Название гена:** ген аминогликозидацетилтрансферазы; ELQ81679, locus_tag="SRIM_19072" (contig00068)
- 8. Происхождение:** *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970
- 9. Нуклеотидная последовательность:** 540 п.н.

ATGACCGACGCACACCCCCTCCTCGCCACACCGCCGAACCTCGACGCCCGCACCCGCGCCGCGGC
 CAAAGCCCTCCTCCACGACGTCTTCGAAGGCGACATGACCGACGAGGACTGGGACCATGCCCTGG
 GTGGTGTGCATGCCCTGGTGTGGGAGGGCGAGGAGCTGATCGGGCACGCTTCGGTGGTGCAGCGT
 CAGATGGTGCATGCCGGACGGCCTCTGCGGTGCGGTTACGTGGAGGGGGTTCGGCGTCCGCGCGGA
 CCGGCGTGGGCGGGGGCATGGGGCGGCCATGATGACGGCTCTGGAGCGGGTTCGTACGCGACGCCT
 ACGACCTGGGCGCCCTCAGTGCGTCCGACGGGGCCGCGACTTCTACGCGGCGCGGGGCTGGCAG
 CTGTGGCGCGGCCCTCGTACACGCTGGCCCCGGGCGGGCTGGAGCGTACCGAGGAGGAGGACGG
 CGGGATCTATGTGCTGCCGGGGGCTGTGCCGCTGGATCTGACGGGGGACTTGGCTTGTGATTGGCG
 GAGTGGGGACGTCTGGTAG

10. Локализация гена и его окружение:

Название гена и кодируемого им белка	Locus_tag	Позиции начала и конца в хромосоме
Гипотетический белок	SRIM_19042	24657-25520
Белок tRNA/хеликазного типа, связывающий нуклеиновые кислоты	SRIM_19047	25524-25874
Двукомпонентный регулятор	SRIM_19052	26003-26686
Двукомпонентная сенсорная киназа	<u>SRIM_19057</u>	26811-29378
ABC транспортер мембранного типа	SRIM_19062	29533-31452
ABC транспортер	SRIM_19067	31456-32280
Аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза	SRIM_19072	32454-32993
калий-транспортер АТРаза субъединица С	SRIM_19077	33071-33724
калий-транспортер АТРаза субъединица В	SRIM_19082	33731-35845
калий-транспортер АТРаза субъединица А	SRIM_19087	35887-37563
Мембранный белок	SRIM_19092	37572-37661
Гипотетический белок	SRIM_19097	37776-38774

II. Описание белка

1. Название белка: Аминогликозидацетилтрансфераза; ELQ81679.1

2. Белковая последовательность: 179 остатков, 19,317 кДа

MTDAHPLLAHTAELDARTRAAAKALLHDVFEQDMTDEDWDHALGGVHALVWEGEELIGHASVVQR
 QMVHAGRPLRCGYVEGVGVRADRRGRGHGAAMMTALERVVVRDAYDLGALSASDGAADFYAARGW
 QLWRGPSYTLA PGGLERTEEEDGGIYVLPGAVPLDLTGDLACDWRSGDVW

3. Изоэлектрическая точка: 4,87

4. Доменная структура белка:

Регион "NAT_SF, N-Acyltransferase superfamily; cl17182" – 21 -129 а/к;

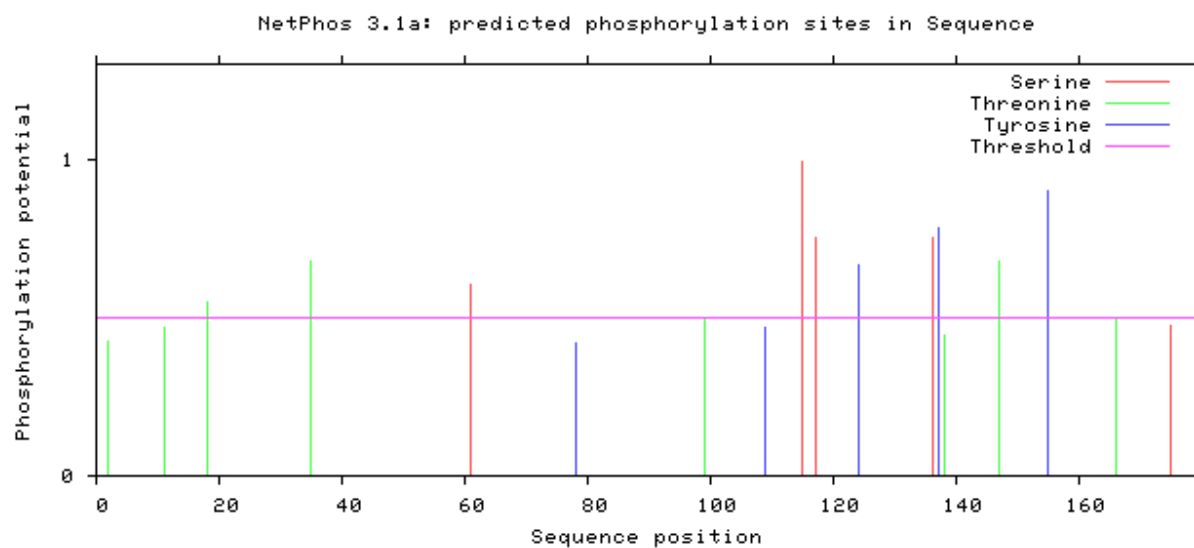
"Coenzyme A binding pocket [chemical binding]" –82-84, 94-95 а/к

5. Наличие потенциальных сайтов фосфорилирования:

По Программе NetPhos 3.1

с вероятностью более 90%:

S₁₁₅ - 99,3 %

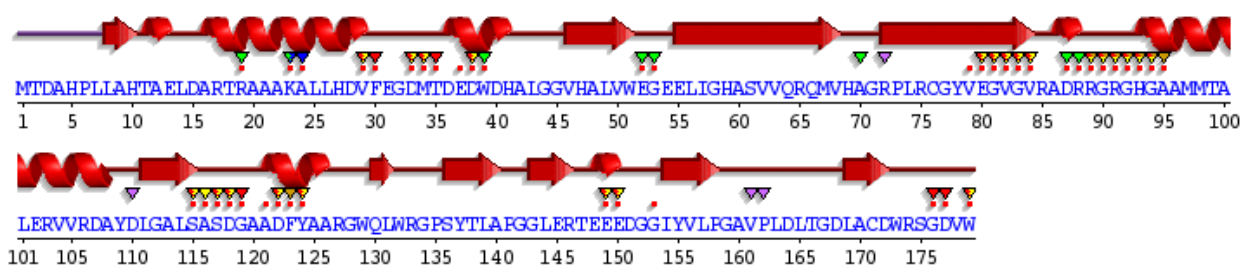


По Программе NetPhosVac 1.0

с вероятностью более 70 % - нет

1. Предсказание вторичной структуры белка:

по программе Sequence annotated by structure (SAS)



7. Наличие кристаллической структуры, гомология с известной 3D структурой:

Отсутствует

Гомологичные кристаллические структуры:

% идентичности	Длина гомологичного участка	Название структуры	Название штамма	№ в GenBank
52,1	172 а/а	Аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза - апоформа	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1m44
		Аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза с коэнзимом А и тобрамицином		1m4d
		Аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза с коэнзимом А и рибустамицином		1m4g
		Аминогликозид-2'-N-ацетилтрансфераза с коэнзимом А и канамицином		1m4i
36,5	170 а/а	Ацетилтрансфераза аас(2')-Ia в комплексе с гентамицином и коэнзимом	<i>Providencia stuartii</i>	5us1b

8. Гомология с подобными генами штамма *Streptomyces rimosus* ATCC10970:

№	Название белка	% идентичности	% сходства	Ссылка на GenBank	locus_tag
1	Гипотетический белок	12%	15 %	ELQ83470.1	SRIM_10156

9. Гомология с подобными генами других видов и родов:

№	Название белка	Название штамма	% иденти- ч-ности	% сход- ства	Ссылка на UniProt, GenBank
1	N-ацетилтрансфераза семейства GNAT	<i>Streptomyces sp. WAC 06725</i>	98%	89%	WP_125532470.1
2	N-ацетилтрансфераза семейства GNAT	<i>Streptomyces sp. NRRL F- 5755</i>	93%	95%	WP_053696106.1
3	N-ацетилтрансфераза семейства GNAT	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	92%	93%	WP_053202043.1
4	N-ацетилтрансфераза семейства GNAT	<i>Streptomyces monomycini</i>	87%	91%	WP_030021233.1
4	N-ацетилтрансфераза	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	85%	90%	GCD34300.1

10. Возможные функции: ацетилирование аминогликозидных антибиотиков