

РУДАКОВА Наталья Николаевна

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
АМИНОГЛИКОЗИДТРАНСФЕРАЗ *STREPTOMYCES RIMOSUS***

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич,
заведующий лабораторией генетики микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института общей генетики им. Н.И.
Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
ТРЕНИН Алексей Сергеевич, заведующий
лабораторией разработки методов поиска биологически
активных соединений Федерального государственного
бюджетного научно-исследовательского института по
изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе

кандидат биологических наук,
ВОЕЙКОВА Татьяна Александровна, главный
научный сотрудник лаборатории белковой инженерии
Федерального государственного бюджетного
учреждения Государственный научно-
исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов – Национального
исследовательского центра «Курчатовский институт»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Институт молекулярной генетики»

Защита состоится «___» декабря в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н.

Горячева И.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Аминогликозиды представляют собой большую группу биологически активных вторичных метаболитов, спектр применения которых сужается из-за появления бактерий, обладающих устойчивостью к ним. Проблема обусловлена не только катастрофическим распространением клинических штаммов бактерий с лекарственной устойчивостью, но и увеличением количества таких бактерий в продуктах питания, а также в почве и водных источниках. В связи с этим становится актуальным исследование почвенных бактерий как основного резервуара и источника генов лекарственной устойчивости. На сегодняшний день аминогликозиды являются одними из широко применяемых в клинической практике антибиотиков благодаря их высокой эффективности и низкой себестоимости. Существует несколько основных механизмов устойчивости к аминогликозидам: модификация мишени действия аминогликозидов – рибосом; уменьшение проницаемости мембраны и активный транспорт из клетки; ферментативная модификация антибиотика. Среди всех известных механизмов устойчивости к аминогликозидам, модификация ферментами является наиболее распространенным. Именно поэтому изучение экспрессии, анализ структуры и функций аминогликозидтрансфераз является важной и актуальной задачей, позволяющей развивать подходы, применяемые для преодоления резистентности к аминогликозидам.

Аминогликозидфосфотрансферазы (Aph) (КФ 2.7.1.) – семейство ферментов, модифицирующих аминогликозидные антибиотики путем фосфорилирования их гидроксильных групп в присутствии АТФ.

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.

Актинобактерии рода *Streptomyces* содержат наибольшее количество генов *aph*. Данные гены могли передаться 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, соответствующий 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.

Степень разработанности темы исследования.

Ранее при изучении спектра устойчивости 110 штаммов рода *Streptomyces* к аминогликозидным антибиотикам было обнаружено, что штамм *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 (продуцент окситетрациклина) обладает устойчивостью ко всем природным аминогликозидным антибиотикам в концентрации до 20 мкг/мл.

Ранее в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 была идентифицирована и охарактеризована аминокликозид-3'-фосфотрансфераза нового типа – AphVIII, установлена трехмерная структура фермента (код PDB 4H05). 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.

Цель работы.

Изучение экспрессии и функций генов, аннотированных как аминокликозид-трансферазы, штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, и их вклад в устойчивость к аминокликозидным антибиотикам.

Задачи исследования.

1. Классификация Aph штамма *S. rimosus* ATCC 10970 на основании филогенетического родства с известными ранее аминокликозидфосфотрансферазами из клинических изолятов и штаммов-продуцентов аминокликозидных 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 аминокликозидным антибиотикам;
3. Выделение рекомбинантных белков Aph *S. rimosus* ATCC 10970, анализ фосфотрансферазной активности и способности к автофосфорилированию;
4. Получение трехмерных структур белков Aph *S. rimosus* ATCC 10970;
5. Изучение экспрессии *aph*-генов при выращивании штамма *S. rimosus* в присутствии аминокликозидных антибиотиков;
6. Идентификация других генов, обуславливающих устойчивость штамма *S. rimosus* ATCC 10970 к аминокликозидным антибиотикам.

Научная новизна.

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

В штамме *S. 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 Aph 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 (СТПК) на повышение устойчивости *E. coli* к аминогликозидам при совместном клонировании гена аминогликозидфосфотрансферазы *aphSR2* и генов СТПК *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* ATCC 10970. В процессе изучения *Aph* 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. 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). Стендовые 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.

Личный вклад автора.

Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации результатов. Биоинформатический и филогенетический анализ *aph*-генов штамма *S. rimosus* ATCC 10970 проводился совместно с к.б.н. Алексеевой М.Г. и к.б.н. Захаревич Н.В. Клонирование генов *aph(3'')-Id*, *aphSR2*, *pkSR1*, *pkSR2* и *aacSR*, изучение их экспрессии в *E. coli* и выделение рекомбинантного белка Aph(3'')-Id проводилось совместно с к.б.н. Алексеевой М.Г. Транскрипционный анализ экспрессии генов резистомы штамма *S. rimosus* ATCC 10970 проводился совместно с Беккер О.Б. Анализ фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro* и исследование автофосфорилирования рекомбинантного белка Aph(3'')-Id *in vitro* проводились совместно с к.б.н. Мавлетовой Д.А., к.б.н. Елизаровым С.М. (Институт биохимии им. А.Н. Баха) и Скобловым Ю.С. (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова). Нарботка биомассы штамма *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET16b:*aph(3'')-Id* в ферментере для последующей кристаллизации белка Aph(3'')-Id проводилась совместно с к.б.н. Алексеевой М.Г. и Князевой Л.М. Автор также являлся основным участником при написании статей по результатам работы.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 154 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, результаты, обсуждение и выводы. Диссертация содержит 43 рисунка и 23 таблицы. Библиографический указатель содержит 225 источников.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 5 тезисов участия на отечественных и международных конференциях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В диссертационной работе глава «Обзор литературы» состоит из 5 разделов. Первый раздел посвящен анализу современных данных по актинобактериям рода *Streptomyces* как резервуару генов лекарственной устойчивости, описывается понятие «резистом». Во втором разделе рассматриваются основные данные по аминогликозидным антибиотикам – химическое строение, история открытия, спектр активности, применение, молекулярный механизм действия, их продуценты. В третьем разделе содержится информация по механизмам устойчивости к аминогликозидным антибиотикам. В четвертом разделе представлен анализ аминогликозидфосфотрансфераз, их эволюционное и структурное сходство с серин-треониновыми протеинкиназами, трехмерные структуры и ингибиторы. Пятый раздел посвящен изучению аминогликозидфосфотрансферазы AphVIII.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования.

При выполнении работы использовали штаммы *E. coli* BL21(DE3), NiCo21(DE3), B834(DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) CodonPlus, DH5 α , а также штаммы *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 и *S. lividans* 66.

Штаммы *E. coli* выращивали на среде Лурия (L-бульон), твердые среды содержали 2.0% агара. Культивирование проводилось при 37⁰C, 250 об/мин. С целью выделения белков в количествах, необходимых для дальнейших структурно-функциональных исследований, выращивали биомассу *E. coli* в ферментере LiFlus GX (Biotronix). Штаммы *Streptomyces* выращивали в жидкой среде YEME при 28⁰C, 250 об/мин.

Анализ устойчивости бактерий к антибиотикам.

Проводили с использованием стандартных методов: линейных разведений, бумажных дисков и минимальных ингибирующих концентраций, описанных в методическом руководстве Ледерберга, а также по стандарту CLSI M100-S17 «Стандарты для определения антимикробной чувствительности». Анализировали устойчивость к канамицину, неомицину, гентомицину, гигромицину, стрептомицину, тобрамицину, изепамицину, паромомицину, амикацину, сизомицину и нетилмицину (Himedia).

Плазмидные векторы.

В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и гетерологической экспрессии генов в клетках *E. coli* использовали векторы pET16b, pET28a и pET32a (Novagen).

Манипуляции с ДНК.

Геномную ДНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970 проводили по методу Кизер и др. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием наборов Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific), а также методом щелочного лизиса с использованием стандартных

методов Маниатис и др. Выделение фрагментов ДНК из 1% агарозного геля проводили при помощи набора, GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific).

Амплификацию методом ПЦР проводили с использованием набора РСК-100 (Dialat Ltd) на приборах PTC-0150 (MJ Research Inc.) и Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология). Используемые при выполнении работы олигонуклеотиды подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST (www.ncbi.nih.gov/tools/primer-blast/). Синтез олигонуклеотидов проводили в фирмах «Синтол» и «Евроген». Выделение фрагментов ДНК проводили набором GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific). Для проверки результатов амплификации проводили электрофорез в 1% агарозном геле.

Манипуляции с РНК.

При проведении транскрипционного анализа экспрессии генов штамма *S. rimosus* ATCC 10970 выделение тотальной РНК данного штамма проводили с использованием набора TRIzol® RNA Isolation Reagents (Invitrogen). Реакцию синтеза кДНК по матрице выделенной РНК проводили при помощи набора «iScript Select cDNA Synthesis kit» (Bio-Rad). Реакцию амплификации ДНК в режиме реального времени проводили с использованием набора «qPCRMix-HS SYBR» фирмы Евроген на приборе CFX96 (Bio-Rad).

Молекулярное клонирование.

Клонирование генов трансфераз проводили по методике, описанной Сэмбрук и др. Компетентные клетки *E. coli* получали кальциевым методом (0.1 М раствор CaCl₂).

Анализ экспрессии *aph* генов в системе *E. coli*.

Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие сконструированные плазмидные векторы, выращивали при 37°C и 250 об/мин на среде L-бульон (с добавлением ампициллина в концентрации 150 мкг/мл как селективного маркера). Культивирование проводилось до оптической плотности 0.6 (~ 2 часа), экспрессию индуцировали добавлением 1.0 mM изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Далее проводили культивирование при 28°C в течение 16 часов, после чего биомассу осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 12 000 об/мин и замораживали при -20°C. Анализ экспрессии *aph* генов проводили по наличию их белковых продуктов при помощи метода электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле по Лэммли.

Выделение рекомбинантных белков.

Выделение и очистку белков проводили методом металлоаффинной хроматографии набором Ni-NTA Spin Kit по протоколу фирмы Qiagen. Концентрацию выделенных белков определяли с использованием флюориметра набором Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen).

Анализ фосфотрансферазной активности белков *in vitro*.

Для анализа фосфотрансферазной активности белков *in vitro* использовали два метода: метод тонкослойной хроматографии с [γ-³²P]-АТФ для идентификации ³²P-меченного стрептомицинофосфата; метод с использованием люминесцентной реакции.

Метод тонкослойной хроматографии: реакцию проводили в буфере, содержащем 4 мМ NaHCO₃, 20 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 10 мМ MgCl₂, 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 [γ -³²P]-АТФ). 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 полиэтиленимин-целлюлозную пластину для тонкослойной хроматографии (Merck). Хроматографию проводили в 50 мМ KН₂РO₄ буфере (pH 5.4), затем пластины высушивали при комнатной температуре и экспонировали с рентгеновской пленкой в течение 15 минут.

Метод люминесцентной реакции: проводили с использованием набора Kinase-Glo⁺ Plus Luminescent Kinase Assay (Promega) и прибора DTX 880 Multidome Detector (Beckman Coulter) по стандартному протоколу. Фосфотрансферазную активность определяли по величине фосфорилирования аминогликозидного антибиотика, измеряя количество АТФ, оставшейся в ходе реакции.

Исследование автофосфорилирования аминогликозидфосфотрансфераз *in vitro*.

Исследование способности рекомбинантного белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию *in vitro* проводили с использованием двух методов: инкубацией с [γ -³²P]-АТФ; с использованием люминесцентной реакции.

Метод с инкубацией [γ -³²P]-АТФ: белок инкубировали с [γ -³²P]-АТФ в течение 15 минут при температуре 28°C в буферном растворе, содержащем 4 мМ NaHCO₃, 20 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 10 мМ MgCl₂, 60 мМ KCl, и 3 мМ ДТТ. Вносили 2 мкг Aph-белка и АТФ до конечной концентрации 10 мМ (содержащего 10 Бк/пмоль [γ -³²P]-АТФ). 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.

Метод с использованием люминесцентной реакции: проводили набором Kinase-Glo⁺ Plus Luminescent Kinase Assay (Promega) на приборе DTX 880 Multidome Detector (Beckman Coulter) по стандартному протоколу. Величину автофосфорилирования определяли, измеряя количество АТФ, оставшейся в ходе реакции.

Биоинформатические методы анализа аминогликозидфосфотрансфераз.

Последовательности генов аминогликозидфосфотрансфераз штамма *S. 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 базы данных NCBI и PDB, программы NetPhos 3.1, NetPhos 2.0, NetPhosK 1.0, NetPhosBac 1.0, ProtParam, SAS, Clustal Omega, GeneDoc, BLAST, MEGA 6.0.6, Statistica V6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение спектра устойчивости к аминогликозидам штамма *S. 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 ко всем природным аминогликозидным антибиотикам в концентрации до 20 мкг/мл. Сравнительный анализ устойчивости штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и модельного штамма *S. lividans* 66 к аминогликозидным антибиотикам проводили методом стандартных дисков. Показано, что штамм *S. rimosus* более устойчив ко всем анализируемым аминогликозидам по сравнению со штаммом *S. lividans*, что согласуется с полученными ранее экспериментальными данными.

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

При биоинформатическом анализе в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 было выявлено 14 генов аминогликозидфосфотрансфераз, обозначенных нами как *aphSR1-14*. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей *aph*-генов *S. rimosus* ATCC 10970 показал, что они имеют низкую гомологию друг с другом (26-36%). 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". Функции белков AphSR3 и AphSR5 (AphVIII) – АТФ-связывание, киназная активность, фосфотрансферазная активность. Функция белков AphSR7, AphSR13 и AphSR14 не охарактеризована. Возможная функция остальных белков – трансферазная активность.

Было построено филогенетическое древо, включающее 14 Aph штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и описанные ранее Shaky и соавторами Aph 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 1). 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%). 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. AphSR2 расположена на одной ветви с Aph(7")-Ia, но бутстреп-поддержка соответствующего узла дерева < 60%. Остальные 11 аминогликозид-фосфотрансфераз 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*.

связывающим карманом. С помощью программы NetPhos 3.0 определены потенциальные сайты фосфорилирования по остаткам серина, треонина и тирозина. С вероятностью более 90% фосфорилирование может происходить по аминокислотным остаткам S₆₁, S₆₄, S₉₉, S₂₄₀, S₂₄₂, Tyr₂₁₉.

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

Для клонирования гена *aph(3'')-Id* (*aphSR3*) в штаммы *E. coli* использовали экспрессионный вектор pET16b. Нарботку фрагмента, содержащего ген *aph(3'')-Id*, проводили путем амплификации с хромосомной ДНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970, используя олигонуклеотиды Aph_08058-fr и Aph_08058-rev, гомологичные N- и C-концевым областям гена и содержащие в своем составе сайты для рестриктаз NdeI и BamHI.

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

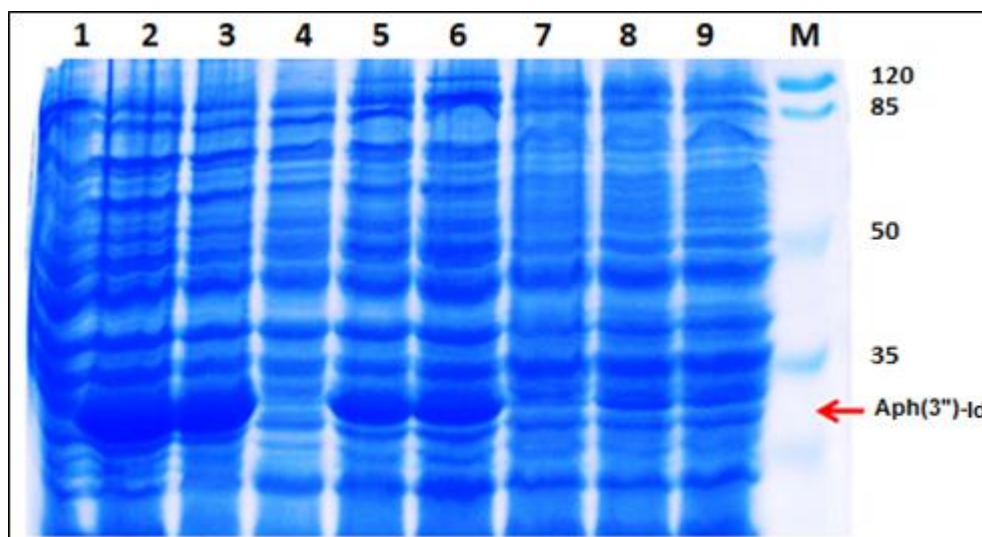


Рисунок 2. Электрофорез растворимой фракции белков штаммов *E. coli*:

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

Исследование спектра и уровня устойчивости клеток *E. 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. 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 (рисунок 3).

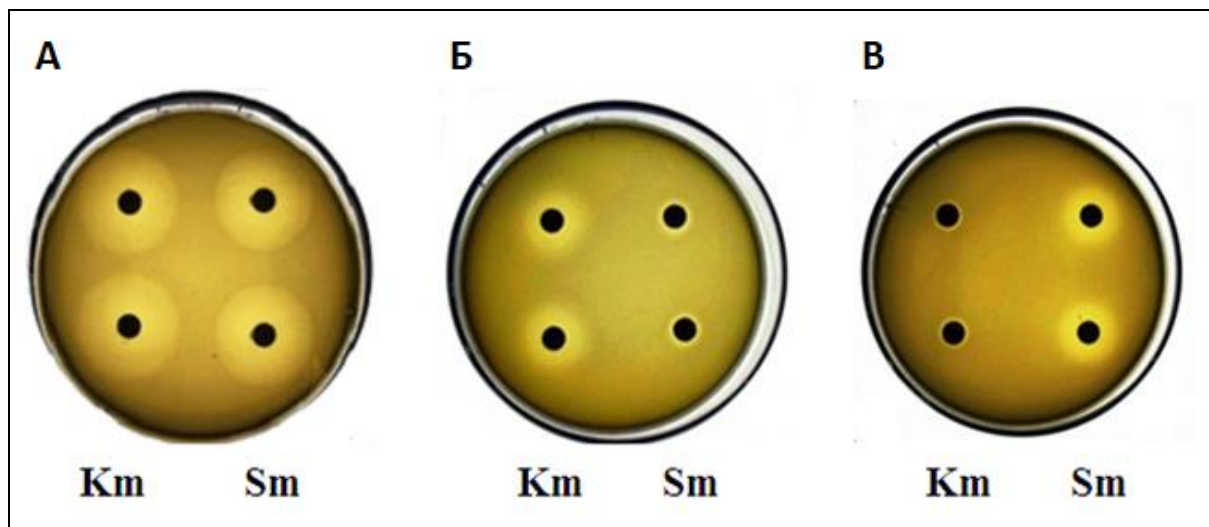


Рисунок 3. Исследование устойчивости штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего *aph* гены, к канамицину и стрептомицину.

А – плаزمида pET16b; Б – плазмида pET16b:*aph(3'')-Id*; В – 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. 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 1.

Таблица 1. Сравнение устойчивости к стрептомицину штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащего генетическую конструкцию рЕТ16b:*aph*(3'')-Id и контрольных проб.

Штамм <i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	BL21(DE3) рЕТ16b	BL21(DE3) рЕТ16b: <i>aph</i> (3'')-Id
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.

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

Из полученной биомассы штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду рЕТ16b:*aph*(3'')-Id, проводили выделение и очистку рекомбинантного белка Aph(3'')-Id методом металлоаффинной хроматографии на His-связывающих Ni-NTA колонках (Qiagen) в нативных условиях. Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза в 12% полиакриамидном геле. Анализ выделенных фракций показал, что целевой белок находится в растворимой форме (лизате), что дает возможность выделения белка в нативных условиях. На рисунке 4 представлена электрофореграмма этапов выделения и очистки белка Aph(3'')-Id. Концентрация выделенного и очищенного белка Aph(3'')-Id (проба 7) была измерена на флуориметре и составила 0.81 (±0.05) мг/мл.

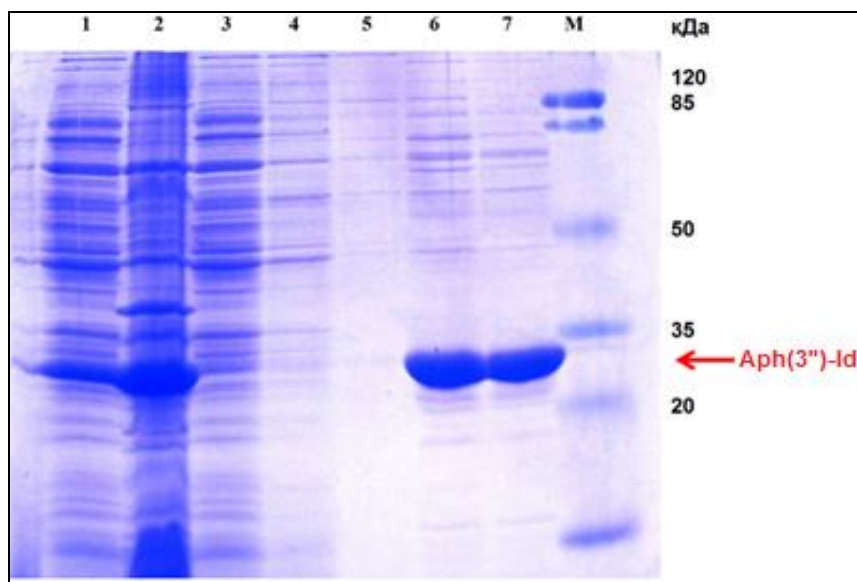


Рисунок 4. Электрофореграмма этапов очистки белка Aph(3'')-Id из штамма *E. coli* BL21(DE3) рЕТ16b:*aph*(3'')-Id: 1 – растворимая цитоплазматическая фракция; 2 – нерастворимая клеточная фракция; 3 – пропуск через колонку; 4 – отмывка 1; 5 – отмывка 2; 6 – элюат 1; 7 – элюат 2; М – маркер молекулярного веса белков SM0441 (BioRad).

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).

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

Для анализа фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro* использовали два метода: метод тонкослойной хроматографии с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и метод с использованием люминесцентной 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 (рисунок 5А). В отсутствии стрептомицина и в присутствии канамицина (отрицательные контроли) активность фермента не наблюдалась. В ходе проведения люминесцентной реакции было установлено, что стрептомицин активно фосфорилируется ферментом Aph(3'')-Id, количество АТФ, включенного в стрептомицин, также прямо пропорционально количеству добавляемого стрептомицина (рисунок 5 Б). Количество белка во всех пробах составляло 20 нг. В отсутствии стрептомицина и в присутствии канамицина (отрицательные контроли) активность фермента также не наблюдалась. Полученные данные указывают на то, что выделенный белок аминогликозидфосфотрансферазы Aph(3'')-Id является ферментативно активным и способным к фосфорилированию субстрата – аминогликозидного антибиотика стрептомицина.

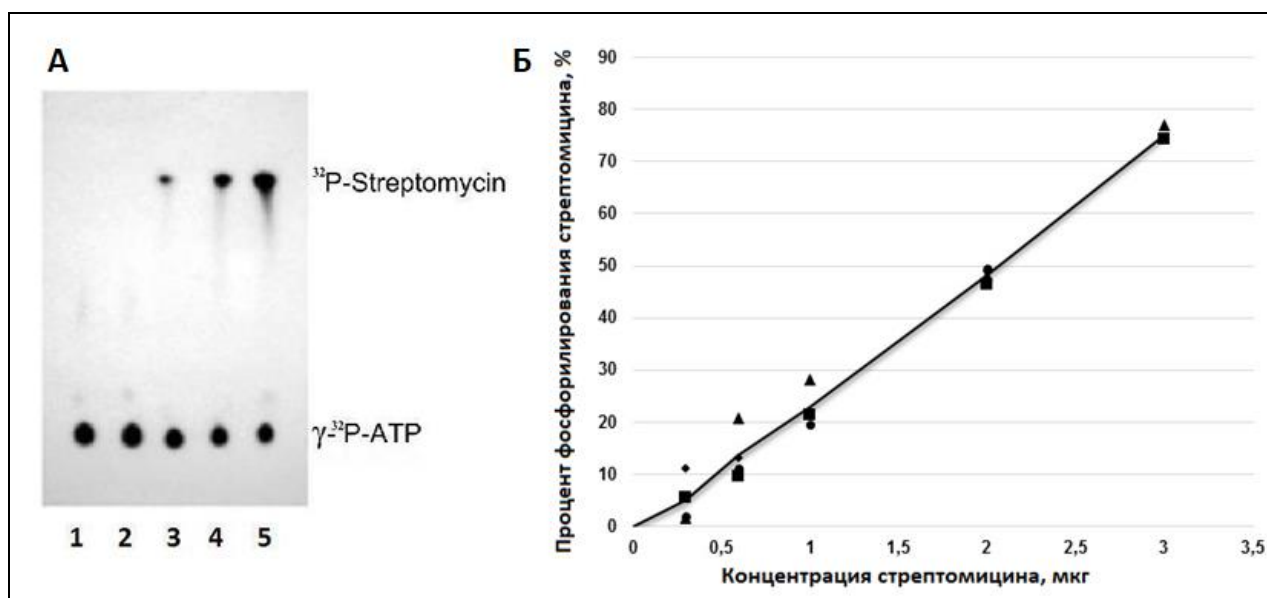


Рисунок 5. Анализ фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro*.

А – автордиограмма 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).

Б – фосфорилирование стрептомицина белком Aph(3'')-Id.

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

Ранее установлено, что ферменты семейства Aph по структуре и функциям имеют сходство с серин-треониновыми протеинкиназами эукариот. Для Aph ранее не была показана способность к автофосфорилированию. Исследование способности рекомбинантного белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию проводили двумя методами: инкубацией с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ и с использованием люминесцентной реакции (рисунок 6). Полученные двумя методами результаты указывают на то, что выделенный белок Aph(3'')-Id обладает способностью к автофосфорилированию.

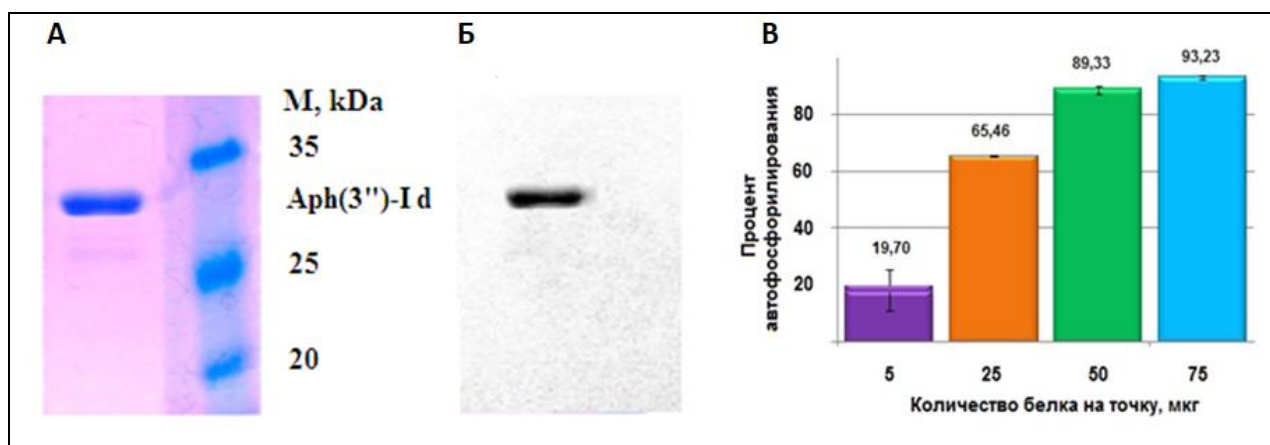


Рисунок 6. Проверка способности белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию. А, Б – с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$; В – при помощи люминесцентной реакции.

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

Б – автордиограмма автофосфорилирования белка Aph(3'')-Id;

В – способность белка Aph(3'')-Id к автофосфорилированию, выраженная в процентах.

Наработка биомассы штамма *E. coli* BL21(DE3) 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 фермента (получена коллегами из института биохимии им. А.Н.Баха и НИЦ Курчатовского института – К.М. Бойко, А.Ю. Николаевой и Д.А. Корженевским, рисунок 7). Установлено, что при формировании комплекса со стрептомицином и АДФ происходит изменение конформации структуры в области 24-29 аминокислотных остатков.

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

Биоинформатический анализ гена *aphSR2*.

Установлено, что ген *aphSR2* расположен в одном кластере с генами двух серин-треониновых протеинкиназ, которым нами были присвоены названия: SRIM_07563 – *pkSR1*, SRIM_07568 – *pkSR2*.

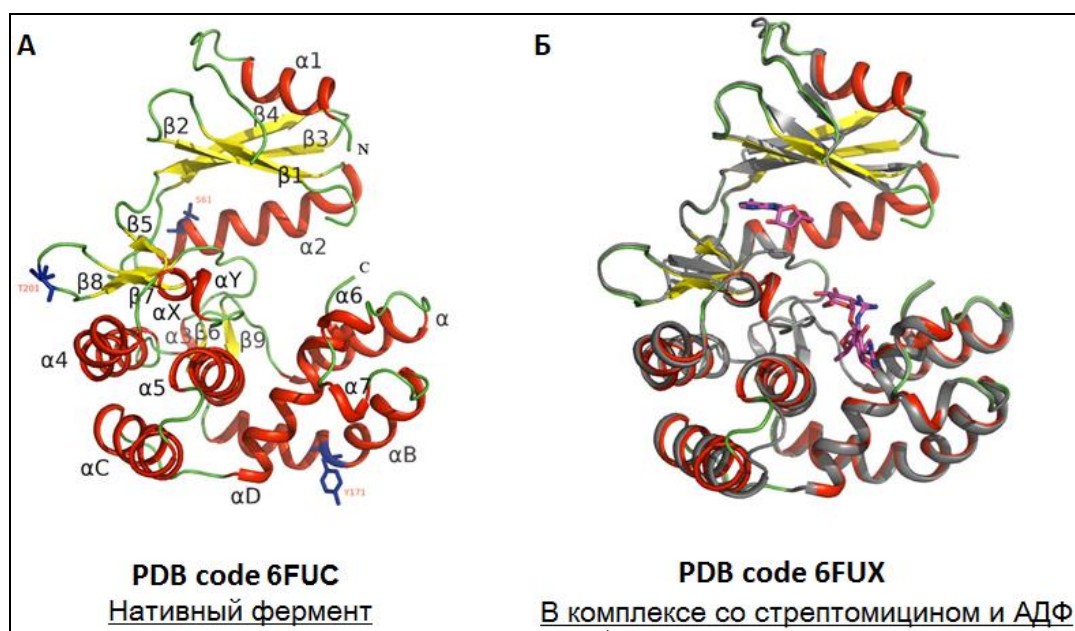


Рисунок 7. Трехмерные структуры белка Aph(3'')-Id.

А – 3D структура Aph(3'')-Id апо-форма;

Б – 3D структура Aph(3'')-Id в комплексе со стрептомицином.

Транскрипция гена *pkSR1* происходит в том же направлении, как и гена *aphSR2* (рисунок 8). Исследуемый ген имеет номер в GenBank ELQ83874.1 и включает 1041 п.н. 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).

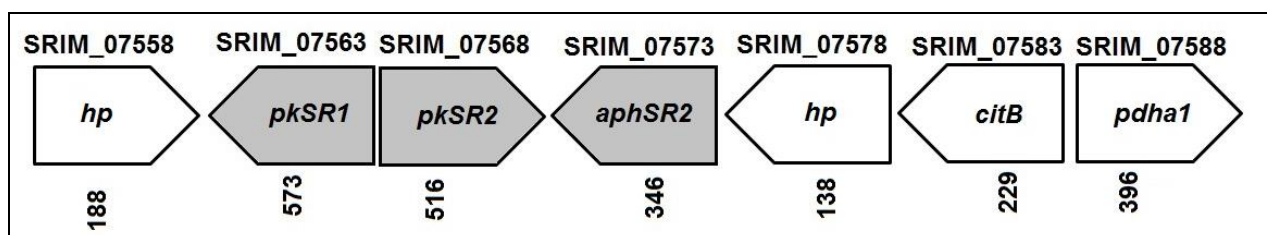


Рисунок 8. Транскрипционная организация кластера генов *aphSR2* и *pkSR1*, *pkSR2* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 (*hp* – hypothetical protein, *citB* – putative two-component system response transcriptional regulator, *pdha1* – pyruvate dehydrogenase E1).

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 %).

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

Клонирование гена *aphSR2* в *E. coli* (локус гена SRIM_07573), было проведено по схеме, аналогичной клонированию гена *aph(3'')-Id* (*aphSR3*), описанной в ранее. Для изучения влияния генов СТПК *pkSR1* и *pkSR2* на устойчивость *E. coli* BL21(DE3), содержащих ген *aphSR2*, к аминогликозидам проводили совместное клонирование этих генов в составе экспрессионного вектора pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции XbaI и XhoI. Для изучения экспрессии генов *aphSR2*, *pkSR1*, *pkSR2* полученными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3), выращивали в жидкой среде и анализировали SDS-электрофорезом 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 9).

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

Спектр устойчивости к аминогликозидам определяли методом стандартных дисков (таблица 2). Показано, что ген *aphSR2* обуславливает устойчивость *E. coli* BL21(DE3) к неомицину и гиромоцину. 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. Эти результаты позволяют предположить, что ген *aphSR2* может быть кандидатом устойчивости к гиромоцину у *S. rimosus*.

Далее проводили тестирование уровня устойчивости методом анализа МИК: 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. 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 аккумулятивным результатом их совместной экспрессии в *E. coli*.

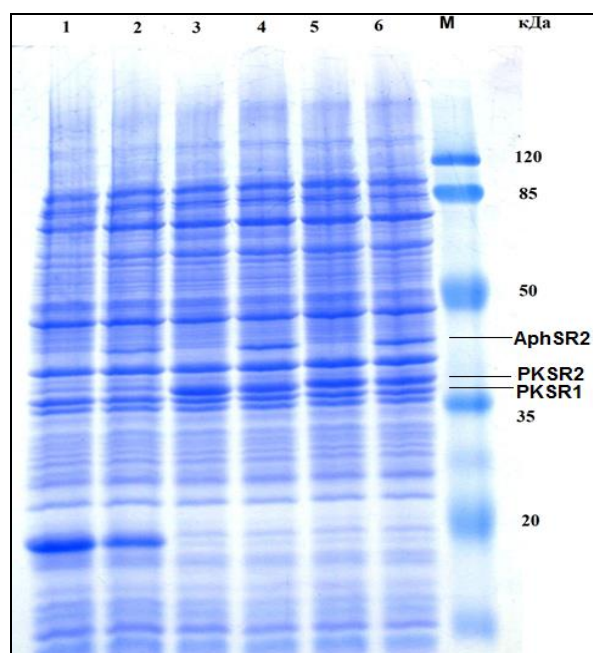


Рисунок 9. Электрофорез растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиды: 1 – pET32a, 2 – pET32a:*aphSR2*; 3 – pET32a:*pkSR1*, 4 – pET32a:*aphSR2+pkSR1*, 5 – pET132a:*pkSR2*, 6 – pET32a:*aphSR2+pkSR2*; М – маркер молекулярной массы белков SM0441 (Fermentas).

Таблица 2. 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 + pkSR1</i>	<i>E. coli</i> pET32a: <i>pkSR1</i>	<i>E. coli</i> pET32a: <i>aphSR2 + 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±0,7
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 ±σ (сигма, среднее отклонение).

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

Согласно проведенному филогенетическому анализу, только 3 гена – *aphSR5* (*aphVIII*), *aphSR3* и *aphSR2* относятся к известным подсемействам. Остальные 11 *aph* нельзя отнести ни к одному из описанных ранее подсемейств, 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. Проверка экспрессии клонированных генов *aph* в штамме *E. coli* BL21(DE3) показала, 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. 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 и института им. А.Н. Баха).

Исследование уровня устойчивости к антибиотикам штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в присутствии аминогликозидов в субингибирующих концентрациях.

Исследование, проведенное дисковым методом.

Для проведения исследования по изучению механизмов индукции лекарственной устойчивости штамма *S. rimosus* ATCC 10970 были определены концентрации антибиотиков, не влияющие на динамику роста культуры клеток данного штамма. В качестве индукторов были выбраны аминогликозидные антибиотики стрептомицин и канамицин, субингибирующая концентрация которых составила 30 нг/мл и 60 нг/мл соответственно. Оценка уровня индукции лекарственной устойчивости проводилась для широкого спектра антибиотиков, принадлежащих к различным химическим группам. Установлено, что под действием на культуру клеток *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 аминогликозидных антибиотиков канамицина и стрептомицина, не было обнаружено значимых изменений зон ингибирования роста и индукции устойчивости к аминогликозидным антибиотикам.

Транскрипционный анализ генов резистомы *S. rimosus* ATCC 10970.

Проводили транскрипционный анализ 18 генов резистомы *S. rimosus*: *aphSR1-14*, *marR*, *tetR*, *lysR* и *whiB*, уровень экспрессии которых нормировался по уровню экспрессии генов домашнего хозяйства – *polA* и гена, кодирующего GTPase. Методами биоинформатического анализа было установлено, что в окружении *aph*-генов находятся гены нескольких семейств транскрипционных факторов, регулирующих устойчивость к антибиотикам у других микроорганизмов. В окружении гена *aphSR3* находятся гены двух транскрипционных факторов – семейства LysR (ELQ83810.1) и семейства TetR (ELQ83818.1), в окружении гена *aphSR4* – семейства MarR (ELQ83437.1), в окружении гена SR12 – транскрипционный фактор WhiB (ELQ79847.1). Сделано предположение, что данные факторы транскрипции могут регулировать экспрессию исследуемых генов *aph*. Таким образом, для проведения транскрипционного анализа генов резистомы *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 были отобраны гены *aph* и четырех транскрипционных факторов: *tetR*, *marR*, *lysR*, *whiB*.

В результате проведения транскрипционного анализа генов резистомы *S. rimosus* ATCC 10970 установлено, что стрептомицин и канамицин не индуцируют экспрессию генов *aph* данного штамма. Добавление стрептомицина индуцировало экспрессию транскрипционного регулятора *tetR* (рисунок 10). У представителей рода *Streptomyces* большое количество генов семейства *tetR* расположены в кластерах генов регуляции биосинтеза антибиотиков и устойчивости к ним. Часто они регулируют экспрессию протонных помп, обеспечивающих активный транспорт антибиотиков из клетки.

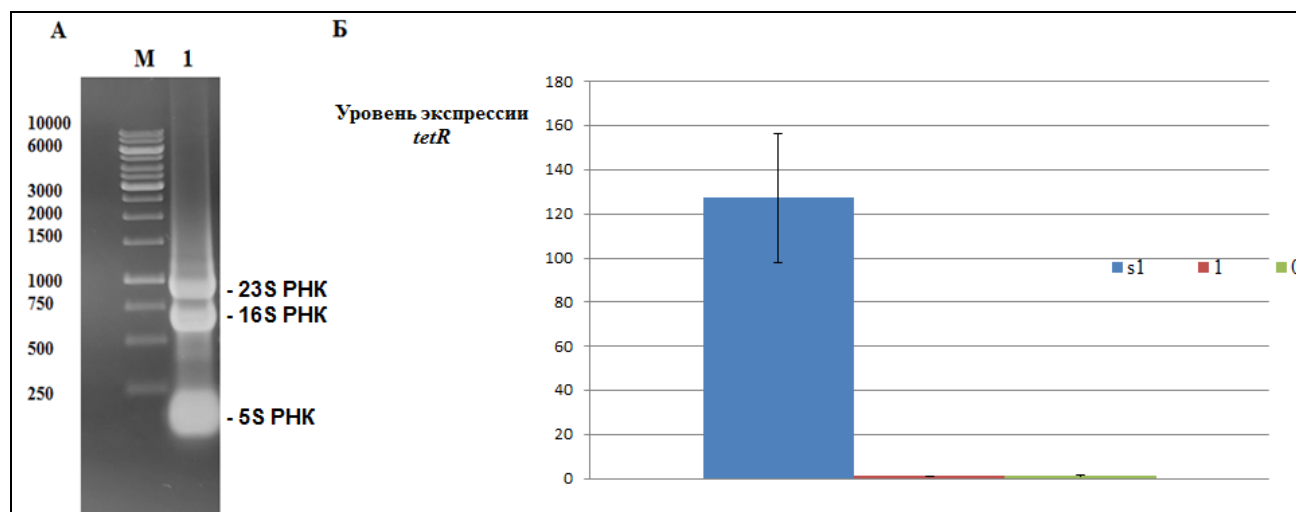


Рисунок 10. Транскрипционный анализ экспрессии генов резистомы штамма *S. rimosus* ATCC 10970: А – электрофорез выделенной РНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970 (РНК не денатурирована перед постановкой электрофореза): 1 – тотальная РНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970, М – маркер SM0313 (Fermentas); Б – экспрессия гена транскрипционного регулятора *tetR* после одночасовой индукции стрептомицином в субингибирующей концентрации – точка «S1», без индукции стрептомицином через 1 час после точки «0» – точка «1», в точке перед добавлением стрептомицина в растущую культуру в логарифмической фазе – «0».

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

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. 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.

Гены *aac* у актинобактерий рода *Streptomyces* ранее никогда не изучались. Клонирование гена *aacSR* в *E. coli* проводили в составе экспрессионного вектора pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. Экспрессию анализировали в штаммах *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3), как показано на рисунке 11А. Установлено, что в клетках обоих штаммов наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 37 кДа. Максимальная экспрессия гена *aacSR* установлена в штамме *E. coli* BL21(DE3), который был выбран для проведения дальнейших этапов работы. Проверена устойчивость штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащий ген *aacSR* к различным аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков (рисунок 11Б). Было установлено, что экспрессия гена *aacSR* обеспечивает устойчивость клеток *E. coli* к широкому спектру аминогликозидов: неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину, нетилмицину, изепамицину и паромомицину.

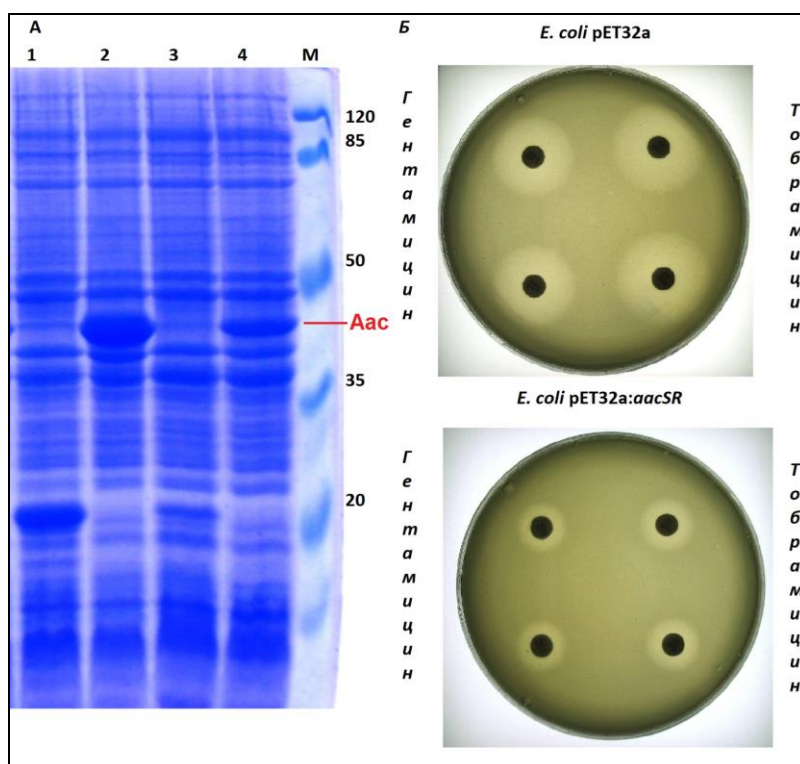


Рисунок 11. Изучение ацетилтрансферазы AacSR:

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 – pET32a, 2 и 4 – pET32a:*aacSR*; М – маркер молекулярной массы белков SM0441 (Fermentas);

Б – устойчивость клеток *E. coli* pET32a:*aacSR* к гентамицину и тобрамицину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе были изучены экспрессия и структурно-функциональные характеристики аминогликозидтрансфераз, 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 аминогликозидфосфотрансферазы 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* резистомы *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, нетилимицину и изепамицину может быть обусловлена геном аминогликозид ацетилтрансферазы *aacSR*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ 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.

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.

3. **Рудакова Н.Н.**, Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Ватлин А.А., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы актинобактерий: структура и функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам у возбудителей туберкулеза и актиномикозов. // III Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» XI съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров. 23–25 ноября 2016 г., Минск, Респ. Беларусь, с. 36.

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.

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность зав. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН д.б.н. проф. **Валерию Николаевичу Даниленко**, с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН к.б.н. **Марии Георгиевне Алексеевой** и с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН к.б.н. **Ольге Борисовне Беккер** за руководство, наставничество и помощь в работе.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН за постоянную поддержку, особая благодарность:

Диларе Анваровне Мавлетовой за помощь на различных стадиях выполнения работы, **Наталье Владимировне Захаревич** за помощь в освоении биоинформатических методов,

Елене Ульриховне Полуэктовой, **Венере Закировне Незаметдиновой**, **Ольге Викторовне Авериной**, **Людмиле Михайловне Князевой**, **Марине Сергеевне Дьячковой**, **Дмитрию Антоновичу Маслову**, **Марии Викторовне Марсовой**, **Александровичу Ватлину**, **Кирриллу Владимировичу Шуру**, **Ксении Михайловне Климиной**, **Наталье Игоревне Акимовой**, **Татьяне Анатольевне Кошенко**, **Марине Викторовне Зайчиковой**, **Майе Валерьевне Одорской**, **Роману Абдаллаевичу Юнесу**.

Автор благодарит к.б.н. **Сергея Михайловича Елизарова** (Институт биохимии им. А.Н. Баха) за помощь на различных этапах работы и д.х.н. **Юрия Самойловича Скоблова** (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова) за возможность и помощь в проведении экспериментов на базе лаборатории изотопных методов.

Отдельную благодарность автор выражает зав. лаб. механизмов гибели опухолевых клеток НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, д.м.н. **Александрю Альбертовичу Штилю**, зав. лаб. разработки методов поиска биологически активных соединений НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе д.б.н. **Алексею Сергеевичу Тренину** и г.н.с. лаборатории белковой инженерии ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов – НИЦ «Курчатовский институт» к.б.н. **Татьяне Александровне Воейковой** за ценные замечания, сделанные при рецензировании данной работы.