

На правах рукописи



Буюклян Юлия Андреевна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ КЛАСТЕРОВ БИОСИНТЕЗА
АНТИБИОТИКОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФИЛУМА АСТИНОМУСЕТОТА**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа была выполнена в научном центре трансляционной медицины автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Научный руководитель:

Бирюков Михаил Владимирович,

кандидат биологических наук

Защита состоится 12 ноября 2026 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.7.13 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» <https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh>

Автореферат разослан “10“ октября 2026 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,

Добряков М. Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Бактерии филума *Actinomycetota* занимают лидирующее положение среди продуцентов вторичных метаболитов, служащих источником антимикробных соединений разнообразных структурных классов. Способность актиномицетов к синтезу антибиотиков представляет собой наследственно закреплённый признак, детерминированный биосинтетическими генными кластерами (БГК). Гены, составляющие БГК, организуют целостную генетическую единицу, способную наследоваться, передаваться горизонтально, фрагментироваться и утрачиваться в ходе эволюции. Согласно биоинформатическим данным, собранным DOE Joint Genome Institute, все продуценты антибиотиков содержат десятки БГК (порядка 20 – 50), экспрессия генов которых может привести к открытию новых специализированных вторичных метаболитов с разнообразной биоактивностью. В природных популяциях реализация данного признака является вариантом модификационной изменчивости и формируется под действием факторов среды, создавая разные фенотипы в рамках одного генетического вида. Такая пластичность обеспечивается сложными регуляторными сетями и имеет глубокое эволюционное значение, позволяя микроорганизмам адаптироваться к меняющимся условиям среды и межвидовым взаимодействиям.

В стандартных лабораторных условиях реализуется лишь 5% от всего выявляемого *in silico* генетического потенциала, а оставшаяся преобладающая часть находится в «молчащем» состоянии и именуется темной материей генома. При этом идентифицируемые соединения зачастую представляют собой уже известные антибиотики, что приводит к их постоянному «переоткрытию». Это связано с тем, что регуляторные системы актиномицетов эволюционно настроены на восприятие специфических сигналов природной среды, которые сложно воспроизвести в искусственных условиях культивирования. Таким образом, проблема заключается не в отсутствии наследственной информации, а в неполной её реализации в лабораторных условиях.

БГК актиномицетов включают последовательности структурных (ответственные за синтез целевой молекулы) и регуляторных (контролирующих время и уровень экспрессии конкретного метаболита) генов, а также участки, кодирующие ферменты инактивации и транспорта антибиотиков. Такие последовательности возникли у актиномицетов для самозащиты. С учетом количественной обширности кластеров в геномах актиномицетов данные микроорганизмы могут рассматриваться как эволюционный резервуар генов резистентности, а также источником распространенности множественной лекарственной устойчивости среди бактериальных патогенов путем горизонтального переноса. Важно отметить, что не все актиномицеты являются

продуцентами антибиотиков, однако они могут обладать обширным набором генов резистентности, что открывает возможность изучать эволюцию устойчивости как самостоятельный наследственный признак, не сопряжённый с продукцией антимикробных соединений. Такие «непродуцирующие» штаммы, особенно представители редких родов, остаются малоизученными, хотя их генетический потенциал может быть значительным.

Таким образом, исследование генетической организации и регуляции кластеров биосинтеза антибиотиков у представителей филума Actinomycetota представляет собой актуальную задачу для частной генетики микроорганизмов, филогенетики и создаёт основу для генетически обоснованного поиска продуцентов и интерпретации маркеров антибиотикорезистентности. Решение этой задачи имеет как фундаментальное значение для понимания механизмов регуляции генов БГК, так и практическое для создания методов направленного получения штаммов-продуцентов ценных антибиотиков.

Степень разработанности темы

Классические методы поиска антимикробных соединений, заложенные в середине XX века Зельманом Ваксманом, позволили обнаружить большинство антибиотиков известных на сегодняшний день. С тех пор, актиномицеты представляют особый интерес в качестве источника основных антимикробных субстанций. Развитие методов высокопроизводительного скрининга раскрыли масштаб кодирующего потенциала актиномицетов. На сегодняшний день, в базе данных MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene clusters) представлено более 3000 аннотированных генных кластеров антибиотиков, для которых описана типовая архитектура и механизмы резистентности продуцента. Кроме того, развиты методы геносистематики (ANI, GBDP) и предсказания БГК (antiSMASH).

Несмотря на выявленный кодирующий потенциал актиномицетов, порядка 95% БГК находятся в «молчащем» состоянии при культивации штаммов в лабораторных условиях. В США, ряде стран Европы и Азии активно проводятся исследования по выявлению регулирующих факторов, влияющих на биосинтетическую способность штаммов. В ряде исследований (Tomm H. A. et al., 2019; Onaka H., 2017; Zou X. et al., 2018) показано, что внешние сигналы, такие как ионы металлов, сигнальные молекулы, транскрипционные факторы, а также подходы геномной инженерии и оптимизация условий культивирования способны переключать метаболические пути и активировать «молчащие» БГК. В России подобные исследования регуляции БГК не выходят за рамки микробиологического скрининга.

Таким образом, комплексные исследования, сочетающие генетический анализ, филогенетическую идентификацию, изучение регуляторных путей, остаются актуальными и необходимыми для понимания механизмов регуляции БГК, а также обнаружения новых антибиотиков.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение молекулярных механизмов регуляции и характеристика генетической организации БГК антибиотиков у представителей филума Actinomycetota.

Для ее достижения были сформулированы следующие задачи:

1. Установить роль ионов железа и транскрипционного фактора DmdR1 в регуляции транскрипции БГК Альбомицина δ_2 и Дефероксамина Е в штамме *Streptomyces globisporus* bja209;
2. Провести направленное редактирование БГК Тетраценомицина Х в штамме *Amycolatopsis comptoni* A23^T с использованием системы CRISPR-Cas9, оценив влияние инактивации регуляторного гена *afsR* на транскрипционную активность кластера;
3. Охарактеризовать геномный набор детерминант множественной лекарственной устойчивости штамма *Krasilnikoviella flava* YrIIa5 и их взаимосвязь с БГК вторичного метаболизма.

Объект исследования

Объектами данного исследования являлись штаммы актиномицетов из почвы на территории РФ: *Krasilnikoviella flava* YrIIa5, *Streptomyces globisporus* bja209 и *Amycolatopsis comptoni* A23^T, их геномы, регуляторные элементы, БГК, а также синтезируемые ими антимикробные метаболиты.

Предмет исследования

Предметом исследования данной работы выступал генетический и филогенетический анализ штаммов *Krasilnikoviella flava* YrIIa5 и *Streptomyces globisporus* bja209, и молекулярные механизмы регуляции транскрипции генов БГК антибиотиков.

Научная новизна

Впервые были изучены молекулярные механизмы регуляции транскрипции генов БГК у актиномицетов на примере штамма *S. globisporus* bja209. Установлено, что ключевым регуляторным элементом, контролирующим переключение между синтезом Альбомицина δ_2 и Дефероксамина Е в штамме *S. globisporus* bja209, являются ионы железа, опосредующие свое действие через транскрипционный фактор DmdR1.

Разработаны и применены инструменты геномной инженерии. Создана репортерная генетическая конструкция pAcTransTest для оптимизации трансформации актиномицетов, а с помощью системы геномного редактирования CRISPR-Cas9 впервые получен штамм *A. comptoni* A23^T с мутацией в гене регулятора AfsR. Показано, что инактивация *afsR* приводит к значительному увеличению транскрипционной активности БГК Тетраценомицина Х и, как следствие, к большей продуктивности штамма.

Теоретическая и практическая значимость

Работа вносит вклад в фундаментальный аспект частной генетики актиномицетов, развивает представления о генетической организации БГК, регуляторных сетях и транскрипционных механизмах, контролирующих вторичный метаболизм у актиномицетов. В ходе работы было выявлено ряд закономерностей регуляции. Так например, влияние ионов железа на транскрипционную активность регулятора DmdR1 и его последующее ингибирующее действие на БГК Дефероксамина Е. Помимо этого было выявлено, что нарушение работы AfsR регулятора БГК Тетраценомицина Х приводит к увеличению транскрипционной активности соответствующего кластера. Данные закономерности имеют общенаучное значение.

Дополнительно, на примере непродуцирующего штамма *K. flava* YrIIa5 охарактеризован геномный набор детерминант множественной лекарственной устойчивости, что расширяет представления об эволюции генов резистентности как самостоятельного наследственного признака, не сопряжённого с продукцией антибиотиков. Выявленные закономерности имеют общенаучное значение для частной генетики микроорганизмов.

Практическая значимость заключается в разработке и апробации эффективных методов генной инженерии и геномного редактирования для направленной модификации актиномицетов, способных синтезировать антибиотики. Созданная плазмида pAcTransTest, оптимизированный протокол трансформации и CRISPR-Cas9 могут быть адаптированы для других трудно трансформируемых актиномицетов.

Методология и методы исследования

Методология работы построена на интегративном подходе, сочетающем микробиологическое выделение почвенных бактерий, молекулярно-генетический анализ их геномов, биоинформатическое картирование БГК, изучение регуляторных механизмов и направленное геномное редактирование.

Одним из основных инструментов скрининга выступала воспроизводительная мишень ориентированная репортёрная система pDualrep позволяющая детектировать соединения, ингибирующие трансляцию (Katushka2S) или индуцирующие SOS-ответ, связанный с нарушением репликации ДНК (TurboRFP), что обеспечивало единый принцип отбора активных штаммов на всех этапах работы.

Выделение актиномицетов проводили из почвенных образцов на селективных средах (ISP2, ISP3, ISP5, ISP6, Органический агар 79) при 28 °С. Идентификацию штаммов выполняли по морфологическим признакам, с последующим секвенированием гена 16S рРНК и полногеномным секвенированием (Illumina HiSeq 4000). Сборку и аннотирование геномов осуществляли с использованием SPAdes v3.13.0 и PROKKA v1.14.5, филогенетический анализ на основе полногеномных последовательностей осуществляли посредством веб-сервиса TYGS

v415 и методов ANI и GBD, идентификацию БГК и регуляторных элементов с помощью antiSMASH 7.0.

Идентификацию антибиотиков проводили комплексом физико-химических методов, включая твердофазную экстракцию, препаративную ВЭЖХ и масс-спектрометрию высокого разрешения (LC-MS/MS). Транскрипционную активность генов БГК оценивали методом ОТ-ПЦР на тотальной РНК, выделенной из клеток, культивированных на средах с варьируемым содержанием ионов металлов.

Для изучения молекулярных механизмов регуляции транскрипции генов БГК применяли метод количественной оценки экспрессии генов с использованием обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) на тотальной РНК, выделенной из клеток штамма bja209, культивированных на различных питательных средах (B0-B5) с варьируемым содержанием ионов металлов. Это позволило установить зависимость транскрипционной активности БГК от присутствия специфических низкомолекулярных индукторов.

Для оптимизации трансформации актиномицетов была разработана репортёрная плаزمида pAcTransTest, несущая гены флуоресцентных белков TurboRFP и Katushka2S. Направленное редактирование генома выполняли с использованием системы CRISPR-Cas9 на основе плазмидного вектора pCRISPOmyces-2, обеспечивающего экспрессию кассеты sgRNA и гена *cas9*. В качестве мишени для мутагенеза выбирали регуляторный ген (*afsR*), ассоциированные с репрессией БГК. Получение мутантных клонов подтверждали фенотипически (по изменению антимикробной активности и зон подавления роста) и аналитически – с помощью ВЭЖХ для количественной оценки продукции целевого антибиотика.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Молекулярным механизмом регуляции переключения между синтезом Альбомицина δ_2 и Дефероксамина Е в штамме *Streptomyces globisporus* bja209 является репрессия БГК Дефероксамина Е транскрипционным фактором DmdR1, опосредованная ионами железа, которые выступают в качестве внешнего сигнального фактора.
2. Ген *afsR* является негативным регулятором в БГК Тетраценомицина Х у *Amycolatopsis comptoni* A23^T, инактивация которого повышает транскрипционную активность кластера и продукцию антибиотика.
3. Штаммы актиномицетов (*Krasilnokoviella flava* YrIIa5), не обладающих способностью синтезировать антимикробные соединения приобрели гены множественной лекарственной устойчивости как независимый наследственный признак, не связанный с продукцией антимикробных метаболитов.

Личный вклад автора

Все представленные в работе результаты получены автором лично либо при его непосредственном участии. Автор самостоятельно выполнил экспериментальную и теоретическую части исследования, провел обработку и анализ данных, а также подготовил тексты публикаций. Идентификация молекулы Дефероксамина Е была выполнена при участии В.А. Алферовой (ИБХ РАН). Обсуждение дизайна экспериментов и результатов проходило с научным руководителем М.В. Бирюковым.

Степень достоверности

Степень достоверности обеспечивается статистически значимым объемом экспериментальных данных и их воспроизводимостью в серии независимых экспериментов. Все проведенные исследования были направлены на достижение поставленных целей и задач. Дополнительным подтверждением валидности результатов служит их апробация в виде публикаций в ведущих рецензируемых отечественных и международных изданиях, индексируемых в таких базах данных, как РИНЦ, Scopus и Web of Science.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на итоговой аттестации направления «Генетика и науки о жизни» Научно-технологического университета «Сириус». А также на 3 конференциях:

1. Конгресс молодых ученых, 2021, Федеральная территория «Сириус», Россия.
2. Биоресурсные коллекции: современное состояние и потенциал для создания новых технологий и инновационной продукции в Российской Федерации, 2022, Федеральная территория «Сириус», Россия.
3. Будущее антимикробной терапии, 2023, Федеральная территория «Сириус», Россия.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 4 печатных работах, в рецензируемых изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы, содержащего 219 наименований. Диссертация изложена на 125 страницах, содержит 44 рисунка и 18 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Поиск и таксономическая характеристика штаммов актиномицетов для исследования биосинтетических кластеров

Изучение генетической организации и механизмов регуляции БГК актиномицетов первоначально производилось путем отбора штаммов, демонстрирующих различный биосинтетический потенциал в условиях лабораторного культивирования. Для этого был проведен скрининг 1050 штаммов актиномицетов, выделенных из природных источников на территории Российской Федерации, с использованием двойной репортёрной системы pDualrep2. Использование данной высокоэффективной мишень ориентированной платформы позволяет детектировать антибиотики с двумя типами активности: ингибиторы трансляции, которые в сублетальной концентрации индуцируют флуоресценцию гена белка *Katushka2S* и индукторы SOS-ответа, связанные с нарушением репликации ДНК и индукцией флуоресцентного гена белка TurboRFP. Такой подход обеспечивает единый принцип отбора штаммов на всех этапах работы. В результате скрининга антагонистической активностью обладали 519 изолятов (49,4% от общего числа изолятов), что подтверждает высокую распространенность БГК в природных популяциях актиномицетов (Рисунок 1).

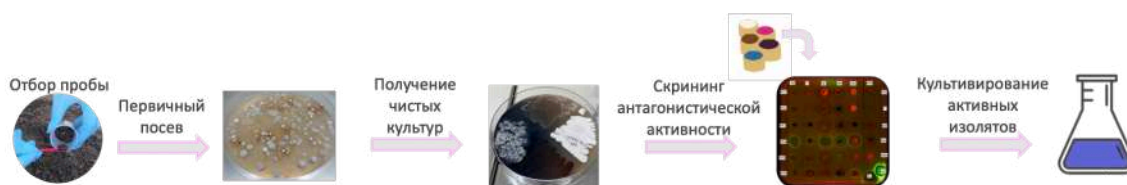


Рисунок 1 – Схема эксперимента по поиску антимикробных соединений из природных источников с использованием репортёрной системы pDualrep2

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализа на основе ANI (Average Nucleotide Identity) и GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny) позволили идентифицировать три ключевых объекта, различающихся по своему биосинтетическому потенциалу и генетической организации: *S. globisporus* bja209 – продуцент двух метаболитов, синтез которых зависит от компонентов питательной среды, *A. comptoni* A23^T – продуцент ценного метаболита, вариант цис-регуляторной активности БГК, *K. flava* YrIIa5 – образец, не обладающий способностью синтезировать антимикробные метаболиты, но демонстрирующий обширный набор генов резистентности.

Такой подход позволил сформировать коллекцию модельных штаммов, различающихся по биосинтетическому фенотипу и филогенетическому положению, что необходимо для решения задач диссертационного исследования (описание генетической организации БГК, экспериментальное изучения их регуляции и направленное редактирование).

Молекулярные механизмы регуляции транскрипции БГК Альбомицина и Дефероксамина Е у штамма *Streptomyces globisporus* bja209

Штамм *Streptomyces globisporus* bja209 был выделен из верхнего А1 гумусового слоя почвы в республике Хакасия (51°42'23.8"N 88°20'10.1"E) в рамках проекта «Гражданская наука». Данный организм синтезирует два антибактериальных соединения – Альбомицин δ_2 – известный ингибитор биосинтеза белка, проникающий в клетки по механизму «Троянского коня» и Дефероксамин Е, для которого впервые была показана способность индуцировать SOS-ответ в пределах бактериальной клетки. Такая сигнал-зависимая регуляция экспрессии генов позволяет исследовать молекулярный механизм регуляции на примерах БГК Альбомицина δ_2 и Дефероксамина Е.

Филогенетическая идентификация штамма *Streptomyces globisporus* bja209

Геном штамма bja209 был секвенирован *de novo* с использованием платформы Illumina HiSeq 4000 с последующей сборкой с помощью SPAdes v3.13.0 и аннотирована с использованием PROKKA v1.14.5. Было выявлено, что геном представлен линейной хромосомой размером 7,865,380 п.о. и линейной плазмидой размером 165, 749 п.о., что в сумме составляет 8,031,129 п.о. с содержанием G+C 71,42%, что характерно для представителей филума Actinomycetota. Анализ данных 16S рРНК и полногеномной последовательности показали, что штамм bja209 принадлежит к виду *S. globisporus* и имеет родство с типовыми штаммами: *S. globisporus* NBC_01004 и *S. globisporus* THF56 (99,49% и 99,48%). Филогенетическая принадлежность штамма bja209 представлена на Рисунке 2.

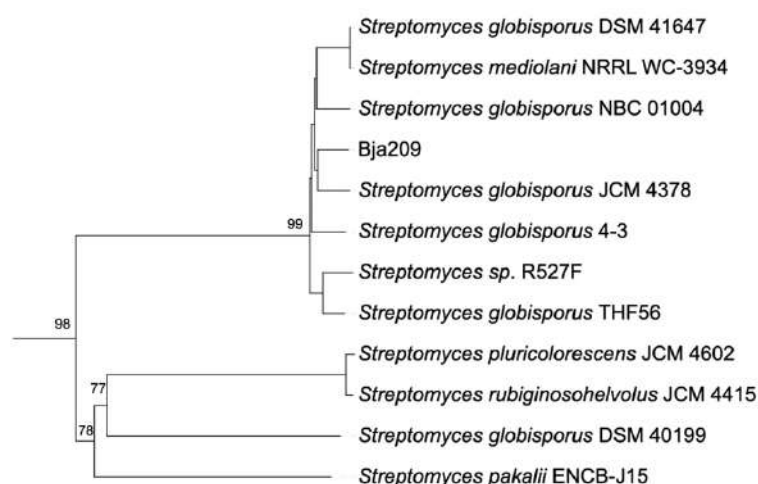


Рисунок 2 – Филогенетическое положение штамма bja209 относительно наиболее близкородственных штаммов, а также типовых штаммов рода *Streptomyces* определенное на основании полногеномных последовательностей. Значения у узлов – бустреп-поддержка >70%

Идентификация антимикробных метаболитов штамма

***Streptomyces globisporus* bja209**

В ходе первичного скрининга *S. globisporus* bja209, выращенного на разных плотных питательных средах ISP, была детектирована антагонистическая активность в отношении тест-штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC. Метаболит, выделяемый bja209 на средах ISP3/ISP5 индуцировал SOS-ответ, а индукция Katushka2S наблюдалась на среде ISP6. Антагонистическая активность метаболитов штамма bja209 приведена на Рисунок 3.

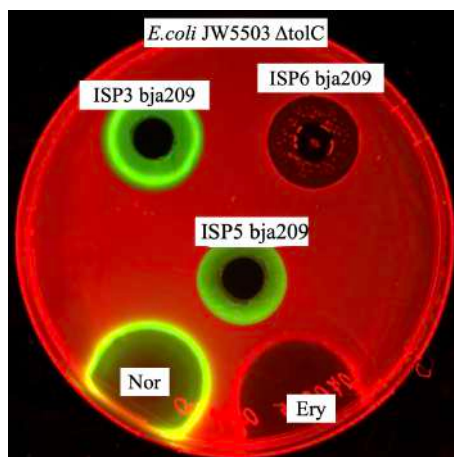


Рисунок 3 – Активность культуральных жидкостей штамма bja209 в отношении тест-штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC pDualrep2

Идентификация метаболитов осуществлялась с помощью ХМСА. Фракция, полученная на среде ISP6 и подавляющая трансляцию содержала метаболит Альбомицина δ_2 , который ионизируется в режиме регистрации положительных ионов и дает интенсивные аддукты $[M+H]^+$ и $[M+2H]^+$ 1046,309095 m/z и 523,659953 m/z, соответствующие моноизотопной массе 1045,3047 Да. Соединение, получаемое на жидкой среде ISP3, индуцирующее SOS-ответ – Дефероксамин Е и ионизируется в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов с интенсивными аддуктами $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$ 601,259708 m/z и 599,346364 m/z, соответствующие моноизотопной массе 600,3483 Да.

Полученные данные свидетельствовали о том, что штамм bja209 способен переключаться между синтезом двух метаболитов в зависимости от состава питательной среды, что послужило основой для изучения экзогенных регуляторных механизмов, контролирующих данный процесс.

Выявление сигнального фактора ответственного за переключение

биосинтетических путей у штамма *Streptomyces globisporus* bja209

Для определения ключевого фактора, ответственного за переключение между синтезами различных метаболитов, был поставлен эксперимент с синтетическими средами, составленными из различных компонентов, входящих в состав ISP5 и ISP6. Полна среда включала все компоненты, варианты производные исключали по одному компоненту. Полученные КЖ тестировали на репортёрном штамме, подвергали препаративной ТФЭ и масс-

спектрометрическому анализу для обнаружения целевых метаболитов. Результаты скрининга КЖ штамма bja209 на разных подобранных синтетических средах отражены на Рисунке 4.

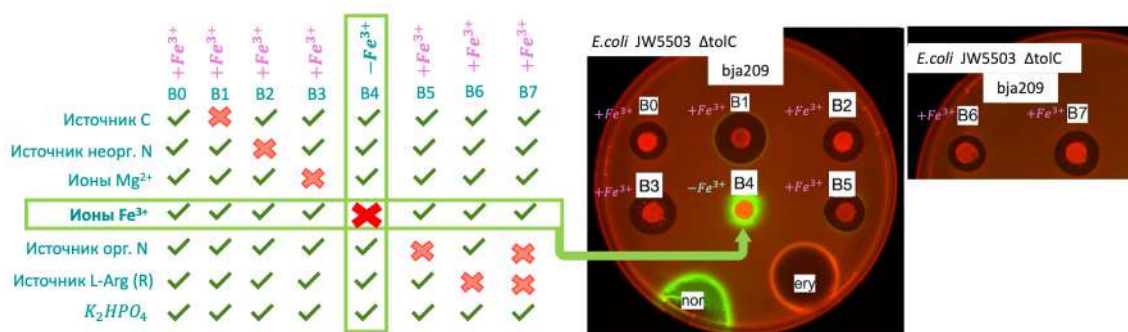


Рисунок 4 – Матрица, отражающая вариации компонентов питательных сред для выявления компонента-индуктора. Скрининг антагонистической активности КЖ штамма bja209 в отношении тест-штамма *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, выращенного на разных синтетических средах. B0-B3; B5-B7 (индукция Karushka2S) и B4 (индукция SOS-ответа)

Было выявлено, что основным фактором, влияющим на переключение между синтезом целевых веществ, являются ионы железа в концентрации 0,2мМ.

На среде B4, не содержащей ионов железа, активировался синтез Дефероксамина Е (индукция SOS-ответа), тогда как на средах с добавлением Fe³⁺ (B0–B3, B5–B7) синтезировался Альбомицин δ_2 (ингибирование трансляции). Таким образом, ионы железа были идентифицированы как внешний сигнальный фактор, определяющий выбор между двумя биосинтетическими путями.

Молекулярные механизмы регуляции транскрипции генов БГК Альбомицина и Дефероксамина Е

В ходе исследования геномного окружения кластера Дефероксамина Е и Альбомицина δ_2 на наличие регуляторных участков было выявлено, что в кластере Дефероксамина Е располагается несколько целевых последовательностей в промоторной области генов *desA* и *desF* что отражено на Рисунке 5. Данные области выступают мишенью для связывания транскрипционного фактора DmdR.

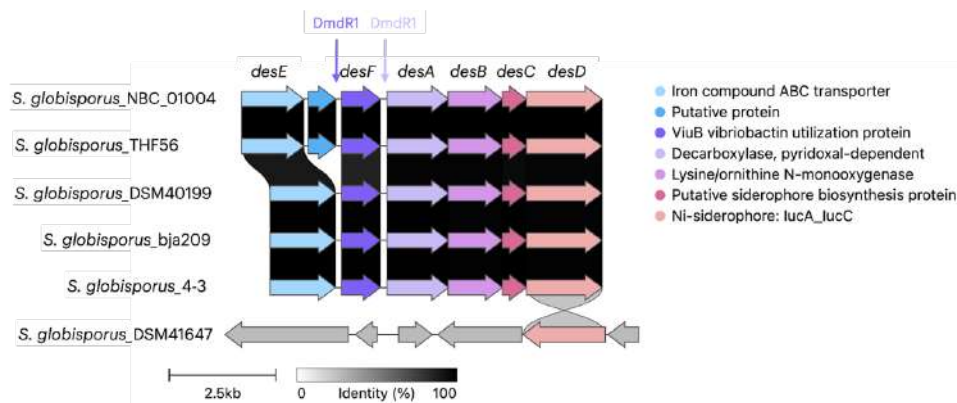


Рисунок 5 – Выравнивание БГК дефероксамина у филогенетически родственных штаммов *S. globisporus*. Гены, кодирующие ключевые биосинтетические ферменты (*desA* – декарбоксилаза;

desB – монооксигеназа; *desC* – ацилтрансфераза, *desD* – синтетаза), высококонсервативны. Штаммы bja209 и 4-3 содержат идентичные БГК, но продуцируют десферриоксалин Е и В соответственно. БГК десферриоксалина содержит последовательности, кодирующие регулятор DmdR1, расположенные выше генов *desF* и *desA*

Для выяснения молекулярного механизма, опосредующего действие ионов железа, была исследована транскрипционная активность генов БГК Десферриоксалина Е методом ОТ-ПЦР с тотальной РНК, выделенной из клеток штамма bja209, выращенных на средах с добавлением железа (B0, B1) и без него (B4). Анализ показал, что ген *desA*, кодирующий декарбоксилазу ключевой фермент биосинтеза Десферриоксалина Е, транскрибируется только в отсутствие железа, тогда как ген *desD* – синтетаза, экспрессируется конститутивно на всех исследованных средах. Это указывало на то, что репрессия БГК Десферриоксалина Е происходит на уровне транскрипции и опосредована железом. Результаты анализа транскрипционной активности генов на Рисунке 6.

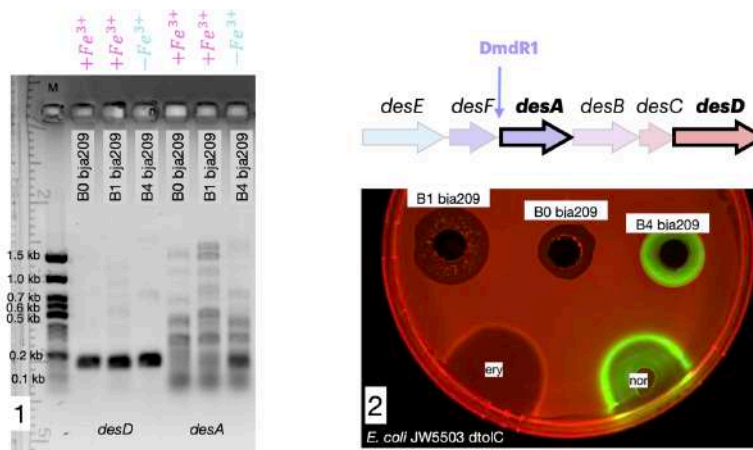


Рисунок 6 – Электрофореграмма ампликонов, полученные в ходе ОТ-ПЦР с тотальной РНК штамма bja209, выращенного на средах B0, B1 и B4; 2 - Чашка с репортёрным штаммом *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, на которой детектируется антагонистическая активность штамма bja209 на средах B0, B1 и B4

На основании полученных результатов был предложен следующий механизм: в присутствии ионов железа регулятор DmdR1 связывает Fe^{3+} и приобретает активную конформацию, позволяющую ему связываться с промоторными участкам *desA* и *desF*, что приводит к репрессии БГК Десферриоксалина Е. Синтез Десферриоксалина Е подавляется, и клетка переключается на продукцию Альбомуцина δ_2 , для биосинтеза которого железо является необходимым субстратом, поскольку Альбомуцин δ_2 представляет собой сидерофорный антибиотик, использующий железо для транспорта в клетку-мишень. Таким образом, был представлен молекулярный механизм регуляции переключения между синтезом двух антибиотиков у *S. globisporus* bja209, ключевую роль в котором играют ионы железа и транскрипционный фактор DmdR1.

Направленное геномное редактирование БГК Тетраценомицина X в штамме *Amycolatopsis camponoti* A23^T

Результаты, полученные при изучении регуляторных механизмов штамма *S. globisporus* bja209, показали, что экспрессией БГК можно управлять с помощью экзогенных факторов. Однако такой подход дает обратимый эффект, зависящий от условий культивации. Поэтому для стабильного и предсказуемого изменения биосинтетического фенотипа требуется воздействие на внутрикластерные регуляторные элементы штамма.

В связи с этим в качестве следующего этапа работы был выбран штамм *A. camponoti* A23^T, обладающий аннотированным геномом и относительно простой трансформируемостью по сравнению с другими актиномицетами. Помимо этого, штамм A23^T способен синтезировать ценный метаболит – антибиотик Тетраценомицин X – ингибитор биосинтеза белка с уникальным сайтом связывания вблизи пептидил-трансферазного центра рибосомы.

Создание репортёрной генетической конструкции для оптимизации трансформации штамма *Amycolatopsis camponoti* A23^T

Низкая трансформационная способность штаммов актиномицетов связана с морфофизиологическими особенностями строения клетки, что накладывает ограничения для использования типичных методов трансформации, разработанных для *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Поскольку этап трансформации является ключевым и важным в генно-инженерной работе, то подбор оптимального метода для конкретного штамма актиномицетов определяет успех всего сайт-направленного мутагенеза. Чтобы оценить эффективность каждого отдельного метода трансформации была создана генетическая конструкция на основе генов двух флуоресцентных белков RFP и Katushka2S. Для получения целевой конструкции pAcTransTest, гены *cas9* и *grna* (из pCRISPOmyces-2) были заменены на гены двух флуоресцентных белков TurboRFP и Katushka2S (pDualrep2).

В случае успешной трансформации и репликации плазмиды в клетках, трансформанты приобретали способность к флуоресценции, что позволяло визуально детектировать положительные клоны. Результаты трансформации штамма *A. camponoti* A23^T на Рисунке 7.

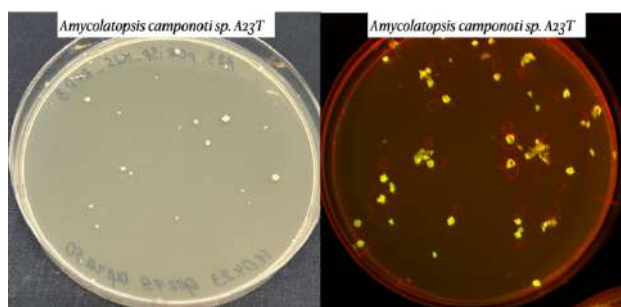


Рисунок 7 – Трансформированные клетки штамма A23^T плазмидой pAcTransTest. Слева чашка при естественном освещении; справа чашка в системе гелъдокументации ChemiDoc при свечении в диапазоне 550-650 нм

Разработанный протокол трансформации был в дальнейшем применён для введения плазмидного вектора на основе CRISPR-Cas9 системы в клетки A23^T.

Сайт-направленный мутагенез БГК Тетраценомицина X с использованием CRISPR- Cas9

Для направленно редактирования БГК Тетраценомицина X был использован плазмидный вектор pCRISPOmyces-2, который включает химерную кассету sgRNA и ген *cas9*, а также сильные конститутивные промоторы для экспрессии элементов CRISPR/Cas, а также оптимизированная последовательность гена *cas9* для лучшей экспрессии в клетках *Streptomyces*. Мишенью для gRNA была выбрана последовательность гена *afsR*. Продуктом гена является белок AfsR, который предположительно обладает ингибирующим действием на БГК тетраценомицина X. Была выдвинута гипотеза о повышении продуктивности штамма A23^T при мутации гена *afsR*. Схема введения мутации в БГК Тетраценомицина X приведена на Рисунке 8.

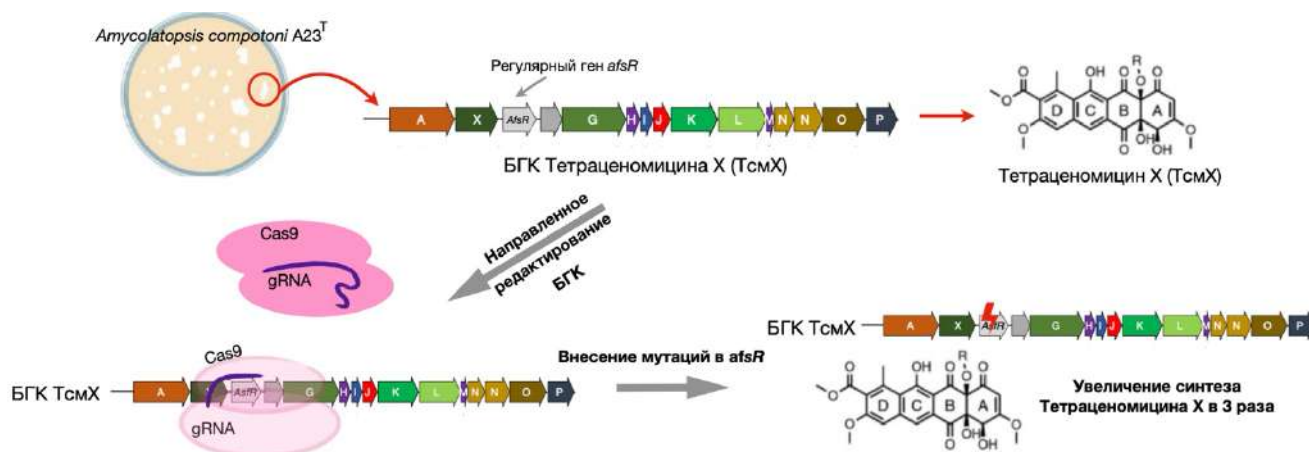


Рисунок 8 – Схема сайт-направленного мутагенеза посредством CRISPR-Cas9 системы на штамме *A. comptoni* A23^T

В результате сайт-направленного мутагенеза был получен клон A23^T с инактивированным геном *afsR* (A23^T_mut_*afsR*). Отбор мутантных клонов проводили по изменению антимикробной активности в отношении тест-штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC. У мутантного штамма наблюдалось увеличение зоны подавления роста по сравнению с исходным A23^T, что свидетельствовало о повышении продукции антибиотика. Размеры зон лизиса оценивались с помощью Antibiotic ZoneScale – C (HIMEDIA).

Оценка продуктивности мутантного штамма *Amycolatopsis comptoni* A23^T_mut_*afsR*

Для количественной оценки продукции Тетраценомицина X был проведён ВЭЖХ-анализ культуральной жидкости исходного и мутантного штаммов. Результаты хроматографического разделения приведены на Рисунке 9.

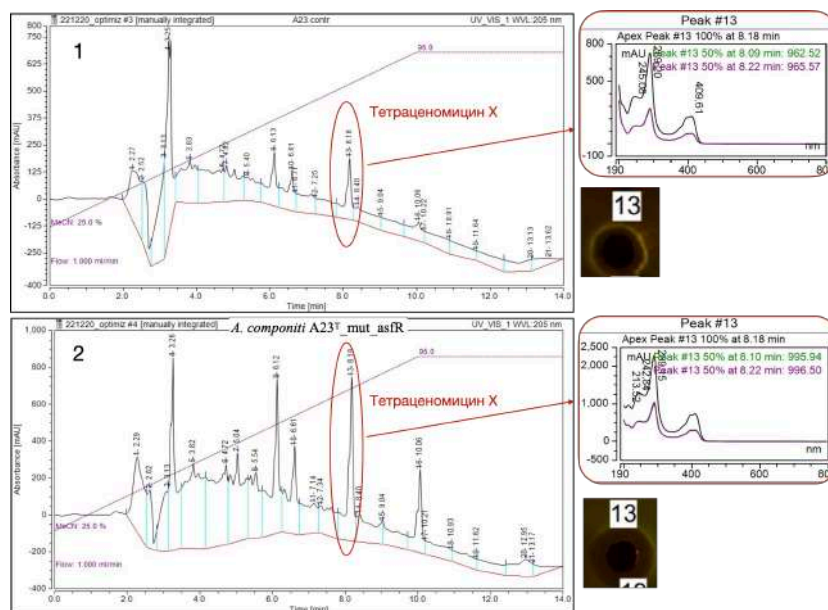


Рисунок 9 – Хроматограмма очищенной КЖ исходного штамма *A. comptoni* A23^T и мутированного *A. comptoni* A23^T_mut_afsR

Хроматографическое разделение показало, что фракция, соответствующая Тетраценомицину X (подтверждено масс-спектрометрическим анализом), полученная из мутантного штамма *A. comptoni* A23^T_mut_afsR, имеет трёхкратное увеличение интенсивности поглощения по сравнению с фракцией из исходного штамма. Таким образом, инактивация гена *afsR* привела к стабильному трёхкратному увеличению продукции Тетраценомицина X при культивации штаммов в одинаковых условиях.

Полученный результат подтверждает ключевую роль AfsR как репрессора БГК Тетраценомицина X и демонстрирует, что геномное редактирование является эффективным инструментом для стабильной активации БГК, дополняющим подходы, основанные на экзогенной регуляции.

Геномный и функциональный анализ представителя *Krasilnikovella flava* YrIIa5 с множественной лекарственной устойчивостью

Исследование штаммов актиномицетов, обладающих способностью синтезировать антимикробные метаболиты, позволило раскрыть механизмы экзогенной и внутрикластерной регуляции экспрессии БГК. Однако в ходе скрининга был обнаружен штамм YrIIa5, который не проявлял антагонистической активности, но демонстрировал множественную устойчивость к антибиотикам. Данное наблюдение позволило предположить, что БГК и ассоциированные с ними гены резистентности могут существовать независимо от синтеза антибиотиков.

Таксономическая идентификация и общая характеристика генома штамма *Krasilnikovella flava* YrIIa5

Штамм YrIIa5 был выделен в рамках проекта «Гражданская наука» из почвы территории музея-заповедника «Ростовский Кремль» (57°11'18.9"N 39°25'08.2"E), на которой в течение 390

лет не производилась хозяйственная деятельность. Образец почвы был извлечен из гумусированного горизонта тяжелосуглинистого механического состава. Культивация микроорганизма осуществлялась на плотной питательной среде с добавлением селектирующих маркеров (рубомидина и рифампицина) для выявления редких представителей актиномицетов.

Геномная ДНК штамма была выделена с чистотой пригодной для полногеномного секвенирования на Illumina HiSeq 4000 с последующей сборкой с помощью алгоритма SPAdes v3.13.0. и аннотирована с использованием алгоритма PROKKA v1.14.5. Размер генома штамма составил 3,879,069 п.о. и содержанием G+C 73,87%, что характерно для членов семейства *Promicromonosporaceae*. Последовательности полногеномного секвенирования и данные 16S рРНК показали, что YrIIa5 имеет наибольшее родство с типовым штаммом *K. flava* DSM 21481^T с уровнем поддержки 99%. Филогенетическая принадлежность штамма YrIIa5 приведена на Рисунке 10.

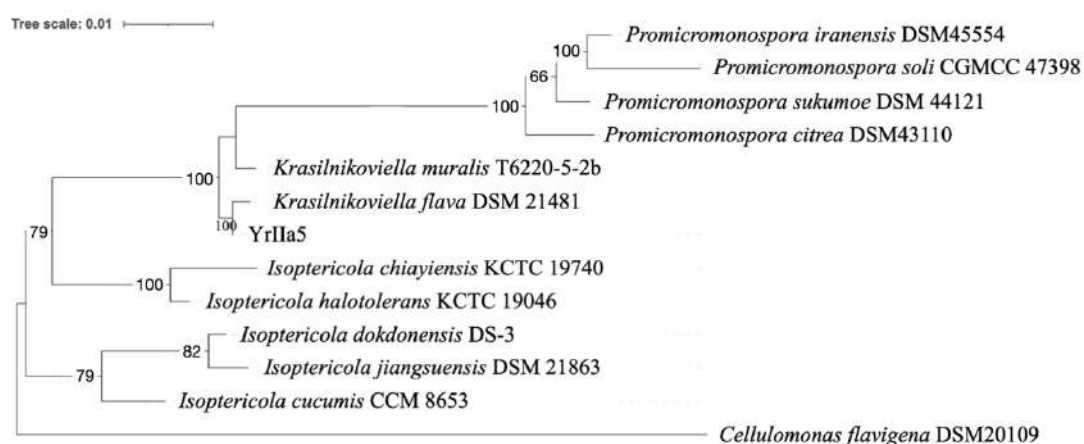


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево штамма YrIIa5 и близких видов определенно на основании 16S rRNA последовательностей. Деревья построены методом максимального правдоподобия с помощью сервиса IQ-TREE v3.1.3. Значения у узлов – бустреп - поддержка >60%

Аннотирование генома YrIIa5 с помощью antiSMASH 8.0.4 показало отсутствие БГК, синтезирующих антимикробные метаболиты. Однако при детальном анализе были идентифицированы остаточные последовательности, гомологичные генам биосинтеза вторичных метаболитов, которые не организованы в функциональные кластеры. Сравнение с геномами филогенетически близких продуцирующих актиномицетов позволило выявить, что многие из этих последовательностей содержат мутации (включая стоп-кодоны и сдвиги рамки считывания), что указывает на их псевдогенизацию. Это позволяет предположить, что предок YrIIa5 обладал БГК, которые в ходе эволюции были утрачены вследствие отсутствия селективного давления на синтез антибиотиков в условиях изолированной почвенной экосистемы с низкой конкуренцией.

Фенотипический профиль антибиотикорезистентности и идентификация генов множественной лекарственной устойчивости штамма *Krasilnikovella flava* YrIIa5

Скрининг антимикробного действия в отношении тест-микроорганизмов (*E.coli* JW5503 Δ tolC и *E.coli* BW25113 lptD) не выявил активности у штамма YrIIa5, что согласуется с отсутствием активных БГК. Вместе с тем, была выявлена выраженная множественная лекарственная устойчивость к широкому спектру антибиотиков: β -лактамы, цефалоспорины, аминогликозиды, фторхинолоны, макролиды, линкозамиды, при сохранении чувствительности к ванкомицину, кларитромицину, стрептомицину, тетрациклину и тетраценомицину X. Аннотация генома (Bakta, CARD, AMRFinderPlus) позволила идентифицировать комплекс генов резистентности, топология которых представлена на Рисунке 11.

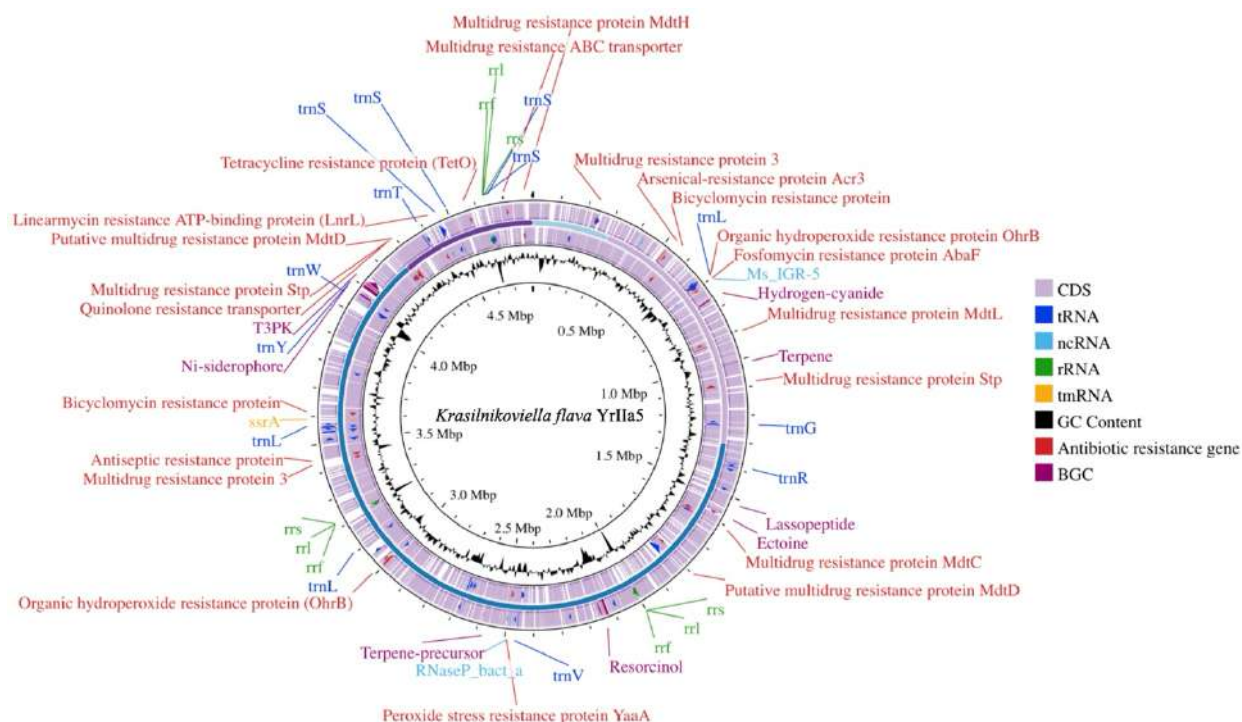


Рисунок 11 – Схема хромосомы *K. flava* YrIIa5 с выделением детерминант множественной лекарственной устойчивости. На схеме отображены: кодирующие последовательности (CDS), гены транспортных РНК (tRNA), некодирующие РНК (ncRNA), рибосомальные РНК (rRNA), матричные РНК (mRNA), а также распределение GC-контента. Отдельно выделены гены, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью (Antibiotic resistance gene), и неактивные БГК (BGC)

Визуальный анализ хромосомы YrIIa5 позволяет идентифицировать локусы, кодирующие белки множественной лекарственной устойчивости, специфические ферменты модификации антибиотиков, а также ряд других транспортеров. Наряду с генами, обуславливающими множественную лекарственную устойчивость, в геноме *K. flava* YrIIa5 были обнаружены последовательности, ответственные за механизмы поддержания клеточного гомеостаза при воздействии негативных факторов окружающей среды. Необходимая для аэробных микроорганизмов защита от активных форм кислорода обеспечивается экспрессией генов

устойчивости к органическим пероксидам *ohrA*, *ohrB* и *ohrR*, а также гена, кодирующего белок YaaA, важный элемент антиоксидантной защиты клеток после перекисного стресса. Найденный в геноме YrIIa5 гомолог эффлюксного переносчика из семейства ACR3 может обеспечивать активный отток арсенитов и антимонов из клеток, обеспечивая их устойчивость к мышьяку и другим ксенобиотикам.

Для определения эволюционного происхождения детерминант устойчивости был проведен филогенетический анализ (IQ-TREE, LG+G4, UFBoot 1000), результаты которого представлены на Рисунке 12.

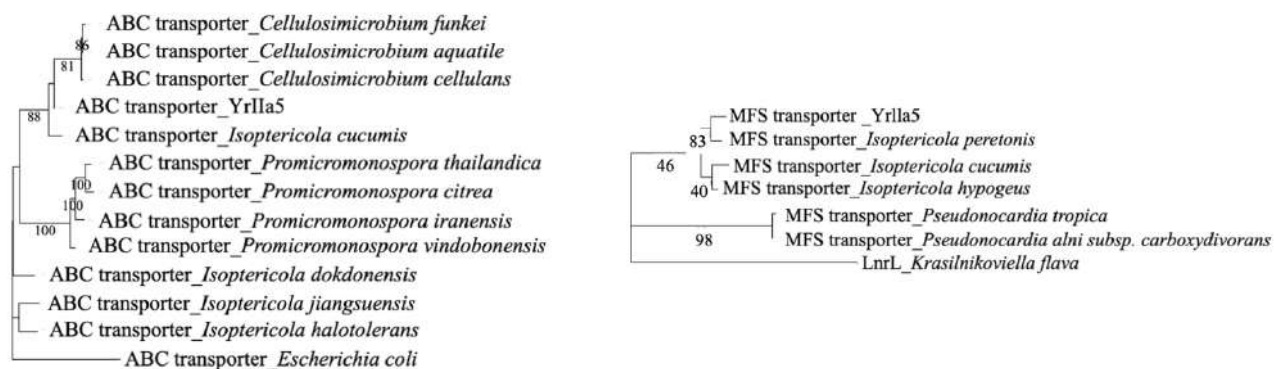


Рисунок 12 – Филогенетический анализ белков множественной лекарственной устойчивости *Krasilnikovia flava* YrIIa5 и его гомологов. Внешними группами служат гомологи из *Escherichia coli* и близкородственных таксонов. Деревья построены методом максимального правдоподобия с помощью сервиса IQ-TREE v3.1.3. Значения у узлов – бустреп-поддержка >70%

Топология деревьев показала, что ABC- и MFS-транспортеры YrIIa5 кластеризуются с гомологами из близкородственных родов *Cellulosimicrobium* и *Isoptericola*, что указывает на их вертикальное наследование в пределах семейства. Кроме того, анализ гена хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*) с включением последовательностей филогенетически отдаленных патогенных таксонов, таких как *Staphylococcus argenteus*, выявил отсутствие недавнего горизонтального переноса: белок YrIIa5 образовал единый кластер с представителями *Promicromonosporaceae* и *Streptomycetaceae*.

Скрининг IS-элементов (ISEScan) обнаружил три частичных копии (IS30, IS21, IS481), которые не фланкируют гены резистентности, что исключает их роль в мобилизации резистома. Исключение составил локус IS481, вблизи которого обнаружен ген Fic-подобного токсина (98% идентичности с *Cellulomonas avistercoris*), указывающий на наличие остаточной токсин-антитоксинальной системы.

Таким образом, множественная лекарственная устойчивость *K. flava* YrIIa5 сформирована преимущественно за счет вертикального наследования генов резистентности и не сопряжена с продукцией вторичных метаболитов. Обнаруженные мобильные элементы представлены лишь частичными, утратившими активность копиями, которые не участвуют в переносе генов. Это

говорит о том, что устойчивость к антибиотикам у *K. flava* YrIIa5 – это стабильный, закрепленный в геноме наследственный признак, а не результат недавних заимствований. Такая картина принципиально отличается от клинических патогенов, где гены резистентности часто формируется за счет активного горизонтального обмена с помощью мобильных элементов, и расширяет наши представления о том, как формируется природный запас генов устойчивости у почвенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе был реализован комплексный подход к изучению генетической организации и регуляции БГК антибиотиков у представителей филума *Actinomycetota*. Данный подход объединял скрининг природных изолятов, филогенетическую идентификацию, геномный анализ, исследование молекулярных механизмов регуляции транскрипции и направленное геномное редактирование.

С использованием репортёрной системы pDualrep2, позволяющей детектировать ингибиторы трансляции и индукторы SOS-ответа, был проведен скрининг 1050 штаммов актиномицетов из различных почвенных образцов РФ. Антагонистическую активность проявили 519 изолятов (49,4%), что подтвердило высокую распространённость биосинтетического потенциала в природных популяциях актиномицетов. На основании филогенетического анализа были отобраны три штамма, каждый из которых позволил решить конкретную задачу исследования.

В ходе изучения штамма *S. globisporus* bja209, продуцирующего два антимикробных метаболита (Альбомицин δ_2 и Дефероксамин Е) в зависимости от условий культивирования, был установлен молекулярный механизм регуляции транскрипции БГК. С использованием ОТ-ПЦР с тотальной РНК и анализа промоторных областей генов БГК показано, что ключевым регуляторным фактором является транскрипционный фактор DmdR1, активность которого опосредуется ионами железа. В присутствии Fe^{3+} (0,2 мМ) DmdR1 связывается с промоторами генов *desA* и *desF* БГК Дефероксамина Е, репрессируя его экспрессию и опосредованно активируя синтез Альбомицина δ_2 . Полученные результаты раскрывают механизм экзогенной сигнал-зависимой регуляции, позволяющий управлять БГК без вмешательства в геном, что может быть использовано для активации «молчащих» кластеров у других актиномицетов.

Для стабильной регуляции БГК был применён подход направленного геномного редактирования на примере штамма *A. comptoni* A23^T, синтезирующего Тетраценомицин Х. Для преодоления низкой трансформируемости актиномицетов была создана репортёрная плазмида pAcTransTest, позволившая оптимизировать протокол трансформации. С использованием системы CRISPR-Cas9 (вектор pCRISPOmyces-2) проведена инактивация гена-репрессора *afsR* в БГК Тетраценомицина Х. Полученный мутантный штамм A23^T_mut_*afsR* продемонстрировал трёхкратное увеличение продукции целевого антибиотика по сравнению с диким типом, что подтвердило ключевую роль AfsR в репрессии кластера и показало эффективность геномного редактирования как инструмента стабильной активации БГК.

Параллельно с изучением регуляции у активных продуцентов был проведён анализ непродуцирующего штамма *K. flava* YrIIa5, который, несмотря на отсутствие антагонистической

активности, демонстрировал устойчивость к селективным маркерам. Геномный анализ выявил обширный набор генов резистентности к спектиномицину, тетрациклину, фторхинолонам, даунорубицину и другим антибиотикам, а также многочисленные гены эффлюксных помп. При этом продуктивные БГК в геноме YrIIa5 отсутствовали, а идентифицированные остаточные последовательности, гомологичные генам биосинтеза вторичных метаболитов, содержали мутации (стоп-кодона, сдвиги рамки считывания), указывающие на их псевдогенизацию. Это позволило предположить, что детерминанты резистентности могут эволюционировать как самостоятельный наследственный признак, не сопряжённый с продукцией антимикробных соединений, что расширяет представления о генетической организации БГК и путях распространения генов резистентности в природных популяциях.

В работе последовательно рассмотрены все этапы: от поиска продуцентов и изучения регуляции БГК до направленного редактирования генома и анализа возникновения генов резистентности. В совокупности полученные результаты создают основу для комбинированного подхода к активации «молчащих» кластеров, сочетающего внешнюю индукцию и геномное редактирование.

Таким образом, на основании диссертационного исследования можно сформулировать следующие выводы:

1. Молекулярным механизмом регуляции переключения между синтезом БГК Альбомицина δ_2 и Дефероксамина Е у *Streptomyces globisporus* bja209 является Fe-зависимое подавление кластера Дефероксамина Е транскрипционным фактором DmdR1.
2. Инактивация гена *afsR* в БГК Тетраценомицина Х у *Amycolatopsis comptoni* A23^T повышает транскрипционную активность кластера и продуцирующую способность штамма в 3 раза.
3. Аннотированные детерминанты множественной лекарственной устойчивости *Krasilnikovella flava* YrIIa5, включая гены эффлюксных транспортеров, локализованы вне кластеров биосинтеза вторичных метаболитов, что указывает на возможность независимого наследования генов резистентности и активных БГК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Buyuklyan J.A.** et al. Modern Approaches to the Genome Editing of Antibiotic Biosynthetic Clusters in Actinomycetes // *Acta Naturae*. – 2023. – V. 15. – №. 3. – P. 4.
2. **Buyuklyan J.A.**, Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V., Sacharov A.A. The regulation of the albomycin and desferrioxamine E biosynthetic in *Streptomyces globisporus* bja209 // *Molecules*. – 2025. – V. 30. – №. 19. – C. 3871.
3. Kiriya A.R., Zakalyukina Y.V., **Buyuklyan Y.A.**, Biryukov M.V. Genomic and functional analysis of a representative of the rare genus *Krasilnikovella*–Strain YrIIa5 with multiple antibiotic resistance // *Microbiology*. – 2025. – V. 94. – №. 1. – P. 98-103.
4. Dobryakov M.Yu., **Buyuklyan J.A.**, Biryukov M.V. The Oxytetracycline Producer *Streptomyces lydicamycinicus* bja295 and Its Genomic Context // *International Journal of Molecular Science*. – 2026. – V. 27. - №. 18. – C. 8403.