



Буюклян Юлия Андреевна

**Генетическая организация и регуляция кластеров биосинтеза
антибиотиков у представителей филума Actinomycetota**

1.5.7. Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Бирюков Михаил Владимирович
кандидат биологических наук

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Общая характеристика филума Actinomycetota	12
1.1.1. Морфофизиологические характеристики штаммов актиномицетов	14
1.1.2. Генетический аппарат и организация биосинтетических кластеров антибиотиков представителей филума Actinomycetota	18
1.2. Молекулярно-генетические основы регуляции биосинтетических генных кластеров в штаммах актиномицетов	23
1.2.1. Регуляция биосинтеза вторичных метаболитов посредством транскрипционных факторов.....	24
1.2.2. Сайт-направленный мутагенез	30
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1. Материалы и приборы	39
2.1.1. Питательные среды.....	39
2.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды	40
2.1.3. Принадлежности	42
2.1.4. Приборы.....	42
2.2. Методы микробиологии	43
2.2.1. Посев и выделение чистых культур актиномицетов	43
2.2.2. Полифазно-таксономическая идентификация штаммов.....	44
2.2.3. Скрининг антагонистической активности штаммов актиномицетов	44
2.2.4. Глубинное культивирование активных штаммов.....	45
2.2.5. Получение компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> с использованием хлорида кальция	45
2.2.6. Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> с помощью метода теплового шока	46
2.2.7. Подготовка электрокомпетентных клеток и условия электропорации	46
2.2.8. Подготовка моноспоровой суспензии штаммов актиномицетов.....	47
2.2.9. Подготовка электрокомпетентных клеток актиномицетов и условия электропорации	47

2.2.10. Подготовка клеток актиномицетов и штамма <i>Escherichia coli</i> для конъюгативного переноса плазмидной ДНК	48
2.3. Методы генной инженерии	49
2.3.1. Полимеразная цепная реакция.....	49
2.3.2. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	50
2.3.3. Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК.....	50
2.3.4. Выделение и очистка тотальной РНК из грамположительных бактерий	51
2.3.5. Выделение и очистка геномной ДНК из грамположительных бактерий.....	52
2.3.6. Сборка ДНК по Гибсону	53
2.3.7. Обработка ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции.....	53
2.3.8. Обратная транскрипция	53
2.4. Биохимические методы	55
2.4.1. Выделение и идентификация активного вещества.....	55
2.4.2. Спектрофотометрическое определение концентрации нуклеиновых кислот	56
2.5. Методы биоинформатики.....	57
2.5.1. Секвенирование и анализ геномов представителей филума Actinomycetota.....	57
2.5.2. Филогенетический анализ представителей филума Actinomycetota на основе полногеномного секвенирования	57
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	58
3.1. Исследование регуляции биосинтеза Альбомицина $\delta 2$ и Дефероксамина Е в штамме <i>Streptomyces globisporus</i> bja209.....	58
3.1.1. Генетический и филогенетический анализ представителя <i>Streptomyces globisporus</i> bja209.....	58
3.3.2. Морфофизиологические свойства штамма <i>Streptomyces globisporus</i> bja209 и закономерности регуляции первичного метаболизма.....	60
3.3.3. Идентификация антибиотических компонентов штамма <i>Streptomyces globisporus</i> bja209.....	66
3.3.4. Определение регуляторного фактора, влияющего на индукцию биосинтеза Альбомицина $\delta 2$ и Дефероксамина Е в штамме <i>Streptomyces globisporus</i> bja209	71
3.3.5. Кластер биосинтеза Альбомицина $\delta 2$ и C-1027 и их распространенность среди видов	76

3.2. Проведение сайт-направленного мутагенеза в клетках <i>Amycolatopsis comptoni</i> A23 ^T посредством CRISPR-Cas9 системы.....	83
3.2.1. Получение генетической конструкции pAcTransTest, предназначенной для оценки эффективности трансформации клеток актиномицетов	83
3.2.2 Сайт-направленный мутагенез с помощью CRISPR-Cas9 системы	90
3.3. Геномный и функциональный анализ представителя <i>Krasilnikoviella flava</i> YrIIa5 с множественной лекарственной устойчивостью	95
3.3.1. Таксономическая идентификация и общая характеристика генома штамма <i>Krasilnikoviella flava</i> YrIIa5	95
3.3.2. Фенотипические и микроморфологические признаки штамма <i>Krasilnikoviella flava</i> YrIIa5.....	97
3.3.3. Фенотипический профиль антибиотикорезистентности и идентификация генов множественной лекарственной устойчивости штамма <i>Krasilnikoviella flava</i> YrIIa5.....	100
3.3.4. Эволюционное происхождение генов устойчивости штамма <i>Krasilnikoviella flava</i> YrIIa5.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110

ВВЕДЕНИЕ

1. 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 [1]. 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 [1]. В природных популяциях реализация данного признака является вариантом модификационной изменчивости и формируется под действием факторов среды, создавая разные фенотипы в рамках одного генетического вида [2, 3]. 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» [4]. Это связано с тем, что регуляторные системы актиномицетов эволюционно настроены на восприятие специфических сигналов природной среды, которые сложно воспроизвести в искусственных условиях культивирования [5, 6]. 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 [7]. 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 [8]. 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.

2. 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 [2, 5, 6] 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.

3. 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:

- а) Установить роль ионов железа и транскрипционного фактора DmdR1 в регуляции транскрипции БГК Альбомицина δ_2 и Дефероксамина Е в штамме *Streptomyces globisporus* bja209;
- б) 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;
- в) Охарактеризовать геномный набор детерминант множественной лекарственной устойчивости штамма *Krasilnikoviella flava* YrIIa5 и их взаимосвязь с БГК вторичного метаболизма.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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 плаزمиды pAcTransTest, оптимизированный протокол трансформации и CRISPR-Cas9 могут быть адаптированы для других трудно трансформируемых актиномицетов.

8. 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 СОС-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 плазмида 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.

9. 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.

10. Соответствие диссертации паспорту научной специальности

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) и направлениям исследований: п. 9. Реализация генетической информации (транскрипция, трансляция). Механизмы регуляции экспрессии генов. Взаимодействие генов; п. 17. Частная генетика микроорганизмов, растений и животных. Геносистематика. Филогенетика; п. 18. Частная генетика вирусов, микроорганизмов, растений и животных.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

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. – P. 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика филума Actinomycetota

Представители филума Actinomycetota (домен Bacteria) входят в число крупнейших таксономических групп и широко распространены в разнообразных микробных сообществах [9]. Для большинства из них характерен высокий уровень содержания GC-пар в ДНК, который у некоторых видов превышает 70% [1].

Происхождение термина «актиномицеты» имеет греческое начало *aktis* (луч) и *mukēs* (гриб) [10, 11], что отражает их характерную черту – формирование мицелиальных структур, свойственное для лучистых грибов. В начале XX века их ошибочно относили к микромицетам из-за внешнего сходства, однако дальнейшие исследования выявили фундаментальные различия между этими группами. С точки зрения размеров мицелия у актиномицетов он на порядок меньше, чем у лучистых грибов, кроме того различия касаются и генетического аппарата, и аппарата реализации генетической информации. По типу метаболизма большинство актиномицетов являются аэробами и хемогетеротрофами, способными утилизировать широкий спектр субстратов, включая сложные полисахариды [12, 13]. Они занимают разнообразные экологические ниши, встречаясь в почве, водных экосистемах, а также формируя симбиотические ассоциации с растениями и животными. Некоторые представители также ведут паразитический образ жизни.

Актиномицеты выступают одними из важнейших источников вторичных метаболитов, включая пигменты, ферменты гидролазы, витамины и антибиотики. Согласно литературным данным, представители рода *Streptomyces* синтезируют до 70% известных антибактериальных молекул [1, 6], которые используются для медицины, биологических исследований и в промышленности [1]. Разнообразие вторичных метаболитов объясняется гипотезой о сигнальной природе данных молекул, которые формируются под действием естественного отбора, сопряженного с эволюцией биосинтетических кластеров антибиотиков актиномицетов в естественных экосистемах [13]. Вторичные метаболиты, продуцируемые актиномицетами, демонстрируют выраженную активность против широкого спектра бактериальных патогенов, включая штаммы с множественной лекарственной устойчивостью. Среди наиболее значимых мишеней этих соединений – клинически важные микроорганизмы, такие как метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) и карбапенем-устойчивые штаммы *Klebsiella pneumoniae*.

Механизм антимикробного действия данных соединений отличается многообразием и высокой специфичностью. Они способны:

- а) Ингибировать процесс трансляции путем связывания с рибосомальными субъединицами;
- б) Необратимо блокировать ключевые ферменты, участвующие в биосинтезе пептидогликана клеточной стенки;
- в) Нарушать целостность и функциональность цитоплазматической мембраны, вызывая потерю клеточного содержимого;
- г) Подавлять репликацию ДНК посредством ингибирования ДНК-гиразы или топоизомеразы.

Такое многообразие молекулярных мишеней делает вторичные метаболиты актиномицетов особенно ценными в контексте преодоления антибиотикорезистентности, поскольку позволяет атаковать патогены по нескольким независимым друг от друга механизмам одновременно.

Подавляющее большинство актиномицетов, в том числе представители рода *Streptomyces*, ведут сапрофитный образ жизни. Для преодоления неблагоприятных условий, таких как дефицит питательных веществ, они формируют устойчивые споры, которые позволяют им длительное время сохранять жизнеспособность [14]. Эта адаптационная стратегия способствовала их широкому распространению в разнообразных экологических нишах, однако наиболее часто актиномицеты встречаются в почве, где они могут быть обнаружены на глубине до двух метров. Численность популяции актиномицетов в природных экосистемах изменяется под влиянием факторов окружающей среды, включая климатические особенности и тип местообитания. Типичная концентрация этих микроорганизмов в почвенных образцах колеблется в пределах 10^6 – 10^9 КОЕ/г. Примечательно, что доминирующее положение в сообществе занимают представители рода *Streptomyces*, составляющие более 95% от общей численности филума *Actinomycetota* [15].

Исследования Хилтнера и Стромера показывают, что численность актиномицетов в почве имеет прямую взаимосвязь от климатических условий и наличия растительных остатков, выступающих в качестве питательных субстратов. В весенне-осенний сезон численность достигает до 30% микробной флоры, а в зимний период снижает до 13 % [16].

Филум *Actinomycetota* является одной из крупнейших таксономических групп среди 18 основных линий, признанных в домене *Bacteria*, включая 5 подклассов, 6 порядков и 14 подотрядов [9, 10]. Роды этой группы проявляют значительное разнообразие в морфологии, физиологии и метаболическом потенциале. В связи с развитием методов полифазно-

таксономического анализа и полногеномного секвенирования таксономия *Actinomycetota* претерпела изменения в соответствии с новыми данными [11].

Филогенетическое описание филума *Actinomycetota* базируется на сопоставлении генов 16S рРНК. На базе нуклеотидных последовательностей производится родовая и видовая характеристика исследуемых штаммов. В дополнение к этому, маркером филогенетического анализа являются гены домашнего хозяйства, такие как: *rpoB*, *ssgB*, а также данные полногеномного секвенирования [17].

Данные молекулярно-генетических и хемотаксономических исследований позволили сформулировать современную классификацию филума *Actinomycetota*. Согласно ей, происходит подразделение на шесть основных классов: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* и *Thermoleophilia* [11]. Среди них доминирующее положение по видовому богатству и разнообразию занимает класс *Actinomycetes*, к которому относится абсолютное большинство (43 из 53) описанных семейств данного филума. Таксономическая структура этого класса также сложна и включает 16 порядков [11].

Представители актинобактерий демонстрируют исключительно высокое разнообразие морфологических признаков. Их клеточная организация варьируется от простых форм, таких как кокковидные (шаровидные) клетки, характерные для рода *Micrococcus*, и палочковидные (например, у *Arthrobacter*), до более сложных структур. Последние включают фрагментарный мицелий (гифы, способные распадаться на отдельные элементы), а также истинный, хорошо развитый и разветвленный мицелий, который является признаком высокой морфологической дифференцировки и характерен для многих представителей этого класса [18].

1.1.1. Морфофизиологические характеристики штаммов актиномицетов

Наиболее обширная группа филума *Actinomycetota* представлена родом *Streptomyces* семейства *Streptomycetaceae*, представляющие собой грамположительные сапротрофные бактерии, обитающие в почве, ризосфере корней и растительной ткани растений. Данные бактерии ведут неподвижный образ жизни, что накладывает ряд морфологических и физиологических механизмов адаптации к значительным изменениям в окружающей среде: климатическим колебаниям или конкуренции со стороны других организмов, населяющих ту же нишу [5].

Подобно нитчатым грибам, они колонизируют частицы почвы, образуя ветвящиеся многогеномные гифы, которые формируют разветвлённую сеть для эффективного использования

локальных источников питательных веществ. Поскольку они не способны к активному движению, их распространение происходит за счёт одноклеточных спор, формирующихся на специализированных непитающихся воздушных гифах, что отражено на Рисунке 1.1 [19].

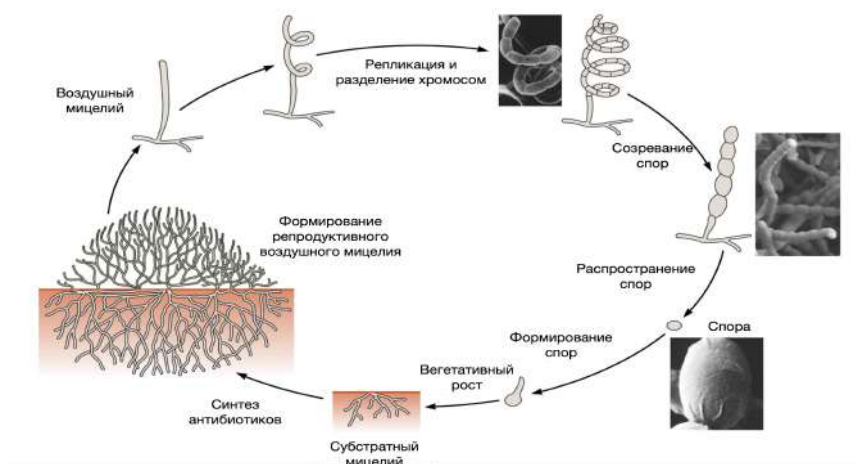


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение жизненного цикла стрептомицета [19, с модификациями]

Эти гифы вырастают из полуводной среды, где находятся вегетативные гифы, и в конечном итоге подвергаются множественным скоординированным клеточным делениям, образуя цепочки спор. Споры затем могут распространяться физическими факторами или благодаря активности подвижных животных, обитающих в той же нише. Морфологическая дифференцировка, приводящая к споруляции, происходит за счёт утраты части вегетативного мицелия, тогда как другие его участки подвергаются физиологической дифференцировке, что приводит к синтезу широкого спектра вторичных метаболитов.

Эти сложные органические молекулы – одна из главных причин, по которым стрептомицеты приобрели статус промышленно значимых микроорганизмов. Они продуцируют большое количество биологически активных вторичных метаболитов, которые используются в медицине и сельском хозяйстве в качестве антибиотиков, противоопухолевых агентов, иммунодепрессантов и пестицидов [20].

Клеточная стенка представителей рода *Streptomyces* относится к первому хемотипу и включает L-диаминопимелиновую кислоту (L-DAP), насыщенные, изо- и антеизо-жирные кислоты. Характеризуются сложным составом полярных липидов дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол и фосфатидилинозитолманнозиды [21, 22].

Колонии растут медленно и часто имеют земляной запах в следствии синтеза летучего метаболита – геосмина [23]. На первых этапах роста колонии имеют гладкую поверхность, но с

течением времени воздушный мицелий может приобретать «опушение» [24]. Для роста необходимы органические источники углерода, неорганического азота, минеральные соли и не требуют витаминов и факторов роста [25]. Большинство видов мезофильные и растут при температуре 10-37 градусов [26], но есть ряд термофильных штаммов *Streptomyces thermonitrificans*, *S. thermovulgaris* и *S. thermoflavus*, проявляющие способность расти при 45-55 градусах [27]. Помимо этого, предпочитают для роста нейтральные или слабощелочные почвы [28].

Первичный метаболизм в клетках стрептомицетов заключается в катаболических и анаболических реакция необходимых для увеличения биомассы и является жизненно необходимым для получения энергии, синтеза белков, нуклеиновых кислот, липидов и полисахаридов. Вторичный метаболизм приводит к образованию метаболитов, не имеющих явной функции в основных метаболических процессах [29]. Фазы роста актиномицетов и сопутствующие этому процессы синтеза метаболитов, представлены на Рисунке 1.2.

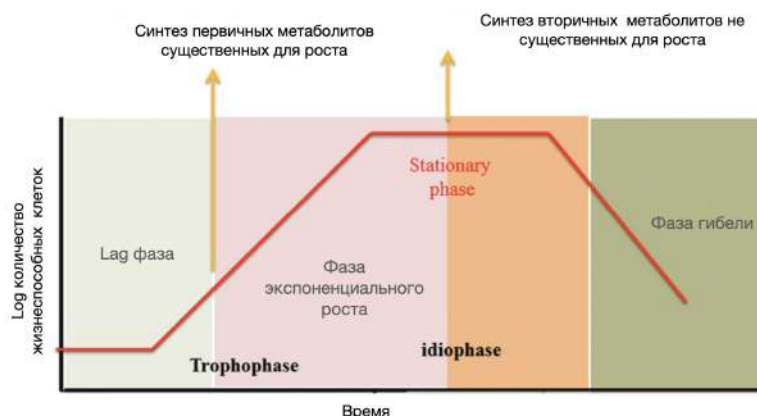


Рисунок 1.2 – Схема бактериального роста и синтеза метаболитов [30, с модификациями]

В случае актиномицетов и особенно стрептомицетов было установлено, что вторичные метаболиты могут образовываться во всех фазах роста – экспоненциальной, стационарной и даже в фазе отмирания [29]. Синтез этих соединений активируется при неблагоприятных условиях окружающей среды, когда ограничение питательных веществ сдерживает рост микроорганизмов. Такие метаболиты широко распространены среди грибов, растений, а также в почвенных и морских экосистемах. Исследования показали, что разные организмы способны продуцировать метаболиты с разнообразной биологической активностью, включая: функции переносчиков металлов, половых гормонов, токсинов, пигментов, пестицидов, иммунодепрессантов, противоопухолевых агентов, антибактериальных веществ, иммуномодуляторов, антагонистов и рецепторных антагонистов [30].

Промежуточные или конечные продукты первичных метаболических путей используются в качестве субстратов для синтеза вторичных метаболитов при участии мультиферментных комплексов. Гены, кодирующие ферменты синтетических путей, как правило, расположены в хромосомной ДНК и чаще всего организованы в виде кластеров, информация будет описана в другом подразделе.

Среди представителей актиномицетов существуют редкие роды, уступающие стрептомицетам в легкости выделения и культивирования традиционными методами, однако характеризуются способностью синтезировать новые ранее неизученные уникальные метаболиты, так например [31]:

- *Amycolatopsis mediterranei* – продуцент Рифампицина;
- *Saccharopolyspora erythraea* – продуцент Эритромицина;
- *Actinoplanes teichomyceticus* – продуцент Тейкопланина;
- *Amycolatopsis orientalis* – продуцент Ванкомицина;
- *Micromonospora purpurea* – продуцент Гентамицина.

Возрастающая тенденция последних десятилетий, связанная с исчерпанием кодирующего потенциала стрептомицетов, приводит к более детальному исследованию «малозаметных» представителей актиномицетов, их биосинтетических возможностей и особенностей [32; 33]. В данной работе особое внимание будет уделено представителю рода *Krasilnikoviella*.

Род *Krasilnikoviella* представляет собой таксон грамположительных бактерий, входящий в состав семейства *Promicromonosporaceae*. Отличительными физиологическими характеристиками этих микроорганизмов являются факультативно-анаэробный тип метаболизма, что позволяет им существовать как в присутствии, так и в отсутствии кислорода. Первичная изоляция типового штамма этого рода имеет необычный источник: он был обнаружен в ходе микробиологического анализа биоповреждений произведений искусства, а именно – выделен с поверхности настенной живописи, где колонизировал плесневелые пятна [34]. С точки зрения хемотаксономии, которая является краеугольным камнем современной классификации актиномицетов, *Krasilnikoviella* обладает уникальным комплексом признаков, четко отделяющим ее от других групп, в частности от широко известных стрептомицетов. Ключевым диагностическим маркером служит строение пептидогликана клеточной стенки. Его основу составляет пептидный мостик типа A4α, с характерным наличием лизина (Lys-type) в качестве диаминовой кислоты, а также глутаминовой и аспарагиновой кислот и аланина [35].

Липидный профиль мембран этих бактерий дополнительно подтверждает их таксономический статус. В его состав входят фосфолипиды: фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол и его производное –

фосфатидилинозитолманнозид, что указывает на сложную организацию их клеточных мембран. Анализ целых клеток также выявил наличие характерных сахаров: галактозы, глюкозы и рибозы.

Важнейшим экологическим и практическим отличием от стрептомицетов является отсутствие у большинства представителей рода *Krasilnikoviella* способности к биосинтезу целого арсенала вторичных метаболитов. В отличие от своих продуцирующих антибиотики родственников, они, как правило, не синтезируют антимикробные соединения, многие гидролитические ферменты и меланоидные пигменты [36, 37].

При этом парадоксальным и представляющим значительный научный интерес является тот факт, что, не производя антибиотики сами, эти бактерии демонстрируют высокий уровень природной устойчивости (резистентности) к широкому спектру известных антибактериальных препаратов. Этот феномен делает их перспективным объектом для фундаментальных исследований [38].

Таким образом, на сегодняшний день род *Krasilnikoviella* остается недостаточно изученным. Его всестороннее исследование, направленное на расшифровку молекулярных механизмов формирования устойчивости к противомикробным агентам, представляет значительную ценность. Подобные изыскания могут внести вклад в понимание эволюции резистентности и разработку новых стратегий борьбы с ней.

1.1.2. Генетический аппарат и организация биосинтетических кластеров антибиотиков представителей филума Actinomycetota

Геномы бактерий, принадлежащих к актиномицетам, характеризуются значительными размерами, которые обычно варьируются в интервале от 5 до 10 м.п.н. Организация их генетического материала отличается вариабельностью: молекула ДНК может иметь как кольцевую топологию, так и линейную структуру, что является довольно редким признаком среди прокариот и наиболее ярко иллюстрируется на примере представителей рода *Streptomyces* [39 - 41]. Важнейшей хемотаксономической и эволюционной характеристикой ДНК актиномицетов является исключительно высокое содержание гуанина и цитозина (GC-контент) в ее нуклеотидной последовательности. У отдельных родов этот показатель является одним из самых высоких среди всех известных организмов и может превышать 70% [41, 42].

Будучи прокариотами, актиномицеты не обладают оформленным клеточным ядром, а их цитоплазма не поделена на мембранные компартменты [43]. Это фундаментальное отсутствие внутренней компартментализации обуславливает ключевую особенность экспрессии генов –

пространственное и временное сопряжение процессов транскрипции и трансляции [8; 44]. Данный механизм, известный как трансляция на растущей матрице, заключается в том, что рибосома способна связываться с 5'-концом молекулы матричной РНК (мРНК) и инициировать синтез белка в тот самый момент, когда эта мРНК еще не до конца синтезирована РНК-полимеразой. Таким образом, процессы считывания генетической информации и синтеза полипептидной цепи протекают практически одновременно в цитоплазматическом пространстве клетки [44].

Кроме основной хромосомной ДНК, геном многих актиномицетов характеризуется наличием дополнительных генетических элементов – линейных мегаплазмид. Наиболее подробно эти структуры изучены на примере модельных штаммов: pSLA2 у *Streptomyces lividans*, pSCP2 у *S. coelicolor* и pPZG101 у *S. rimosus*. Данные плазмиды демонстрируют динамическую природу: они могут интегрироваться в терминальные участки основной хромосомы, существуя как её часть, или находиться в автономном состоянии в цитоплазме в качестве эписом, способных к независимой репликации. Важной особенностью большинства линейных плазмид является наличие у них конъюгативных свойств, обусловленных присутствием специфической последовательности *oriT* (origin of transfer), что позволяет им распространяться горизонтальным путем между клетками. Примечательно, что, в отличие от многих других мобильных генетических элементов, они обычно не несут генов устойчивости к антибиотикам или токсинам [44, 45].

Структурно линейные плазмиды характеризуются наличием терминальных инвертированных повторов (TIR) на концах молекулы [45]. Процесс их репликации происходит по механизму замещения цепи (strand-replacement) и является двунаправленным. Центральную роль в инициации репликации играет специфическая область *origin*, расположенная в центре молекулы. Эта область содержит два перекрывающихся гена (ORF), разделенных АТ-богатым участком: ORF1 (длиной 3231-1996 п.н., кодирующий белок из 411 а.о.) и ORF2 (1999-1598 п.н., кодирующий белок из 133 а.о.). Особый интерес представляет белок, кодируемый ORF2, который содержит характерный АТФ/ГТ-связывающий мотив. Важным эволюционным моментом является наличие значительной гомологии в области ORF1/ORF2 с белками бактериофагов, что может свидетельствовать об их возможном фаговом происхождении [46]. Это сходство предполагает, что в процессе эволюции могла произойти рекомбинация между фаговыми и плазмидными элементами, приведшая к формированию современных линейных генетических структур у актиномицетов.

Ключевой особенностью актиномицетов, выделяющей их среди других прокариот, является необычайно высокая сложность и объем генетического материала. Согласно современным данным полногеномного анализа, именно эти микроорганизмы обладают одними

из самых крупных и насыщенных геномов в домене *Bacteria*. Центральное место в их метаболическом потенциале занимают специализированные участки ДНК, известные как биосинтетические генные кластеры (БГК), которые кодируют пути синтеза вторичных метаболитов [47].

По своей архитектуре БГК напоминают усложненные оперонные структуры. Каждый такой кластер обычно содержит одну или несколько промоторных зон, инициирующих транскрипцию, и полицистронную последовательность генов, объединенных общей физиологической функцией – осуществлением многоступенчатого биосинтеза определенного низкомолекулярного соединения. Структурная организация БГК отличается модульным принципом. В его состав, помимо непосредственно каталитических генов, входят:

- а) Регуляторные элементы, контролирующие активность кластера;
- б) Гены мембранных транспортеров, обеспечивающих выведение конечного продукта из клетки;
- в) Гены резистентности, защищающие штамм актиномицетов от действия синтезируемого антибиотика или токсина.

Важнейшей характеристикой биосинтетических кластеров является строго регулируемая экспрессия. Их активация не является конститутивной и всецело зависит от комплекса внешних и внутренних сигналов. На активность БГК влияют: абиотические факторы окружающей среды (температура, pH, осмотическое давление); наличие и доступность источников макро- (углерод, азот, фосфор) и микроэлементов; фаза роста культуры и особенности жизненного цикла клетки (например, образование мицелия или спор).

Такая сложная система регуляции позволяет микроорганизму тонко управлять энергозатратным процессом синтеза вторичных метаболитов, запуская его только в наиболее благоприятных условиях, что обеспечивает значительное конкурентное преимущество в естественной среде обитания.

Совершенствование технологий высокопроизводительного секвенирования и развитие вычислительных методов биоинформатики произвели революцию в изучении биосинтетического потенциала актиномицетов, синтезирующих антимикробные соединения. Эти подходы позволили идентифицировать и аннотировать множество БГК, раскрывая генетическую основу создания структурного разнообразия вторичных метаболитов [48].

Ключевую роль в построении сложных молекулярных структур антибиотиков играют три основных класса ферментативных систем, гены которых входят в состав БГК:

- Поликетидсинтазы (PKS) – мультиферментные комплексы, работающие по принципу конвейера. Их механизм действия аналогичен синтезу жирных кислот, но с фундаментальным отличием: на каждом этапе элонгации возможны различные модификации растущей

поликетидной цепи (редукция, дегидратация, метилирование). Это приводит к созданию структурного разнообразия продуктов. Различают:

1. Модульные PKS (тип I) – гигантские мультифункциональные белки, где каждый модуль ответственен за один цикл удлинения цепи и его специфическую модификацию;
2. Итеративные PKS (тип II) – набор отдельных монофункциональных ферментов, которые используются повторно в нескольких циклах синтеза;
3. PKS типа III (или халконсинтазы) – относительно простые ферменты, катализирующие конденсацию малонил-КоА без участия ацилпереносящих доменов [49 - 51].

• Нерибосомные пептидсинтетазы (NRPS) – еще одна система конвейерного типа, предназначенная для сборки пептидных соединений нерибосомным путем. Как и PKS, они обладают модульной организацией, где каждый модуль отвечает за включение одной определенной аминокислоты в растущую пептидную цепь. Каждый модуль обычно содержит:

- 1) Домен аденилирования (А-домен) – распознает и активирует специфическую аминокислоту;
- 2) Пептидил-переносящий белок (PCP-домен) – переносит активированную аминокислоту и растущую цепь;
- 3) Конденсационный домен (С-домен) – формирует пептидную связь между цепями;
- 4) Дополнительные домены (эпимеразы, метилтрансферазы, оксидазы) вносят дальнейшие модификации, значительно расширяя структурное разнообразие продуктов за счет включения нестандартных аминокислот и формирования циклических или разветвленных структур [49 – 51].

• Рибосомно-синтезированные и посттрансляционно модифицированные пептиды (RiPPs) – этот класс синтезируется иначе: сначала рибосома производит короткую пептидную цепью-предшественник, которая затем подвергается интенсивной ферментативной модификации (циклизация, образование тиоэфирных мостиков, галогенирование и др.) [49 - 51]. Схематическое описание типов БГК в штаммах актиномицетов представлено на Рисунке 1.3.

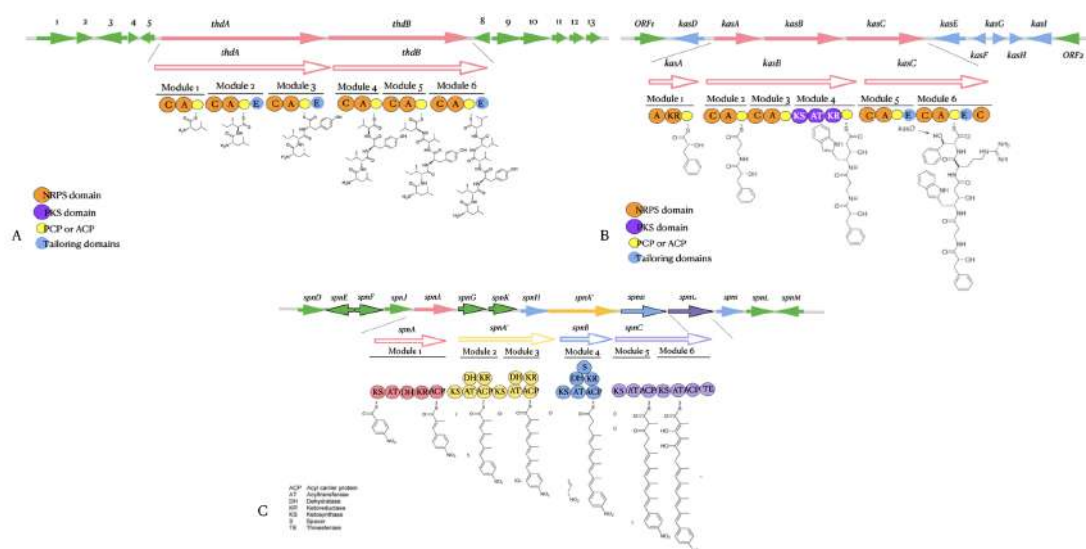


Рисунок 1.3 – Схема кластеров биосинтеза антибиотиков: А) Термоактиноамид А из *Thermoactinomyces* sp.; В) Касугамицин из *Streptomyces kasugaensis*; С) Спинозин из *Streptomyces albus* J1074 [8, 52 - 54]

Особое место в синтезе природных соединений занимают гибридные системы PKS/NRPS, которые сочетают в одном кластере оба типа синтетаз. Это позволяет создавать молекулы-химеры, содержащие как пептидные фрагменты, так и поликетидные «блоки», что ведет к экспоненциальному росту структурного разнообразия и появлению уникальных биологических активностей [49 - 51].

PKS и NRPS способствуют образованию метаболита на белковой матрице. Обе системы выполняют задачу поддержания ковалентно связанных промежуточных продуктов реакции в виде тиоэфиров с одной и той же простетической группой фосфопантетеина. Обычно 4 - фосфопантетеинилтрансфераза (PPTase), специфичная для модульных ферментов, модифицирует остаток серина активного центра в доменах тиолирования (Т) и ацилпереносащего белка (ACP) NRPS и PKS, соответственно, для получения холоферментов. Кроме того, каждый мономер обрабатывается отдельным набором ферментативных доменов, известных как модуль, и обычно в конечном продукте содержится столько же модулей, сколько и мономеров. По этим причинам PKS и NRPS являются тиоматричными модульными системами (TMS) [48].

Минимальный модуль в каждом типе кластеров состоит из трех областей [11]. Существует домен, который ковалентно присоединен к химическому продукту тиоловой связью (ацильный белок-переносчик или пептидильный белок-переносчик для модулей PKS и NRPS соответственно), домен, который выбирает субстрат для встраивания (ацилтрансфераза или аденилирование) и домен, который соединяет растущую цепь с новым субстратом (кетосинтаза или конденсационный белок (NRPS)). Могут существовать дополнительные домены, которые

модифицируют модуль наполнителя, который представляет собой «скелет» конечного продукта биосинтеза [13].

Для модулей PKS немодифицированный модуль наполнителя содержит кето-группу. Восстановительные домены могут модифицировать кетогруппу в трех реакциях. Эти области также контролируют стереохимию [13, 55].

Нерибосомальные пептиды (NRP) – это продукты, которые относятся к классу вторичных метаболитов с разнообразными свойствами, такими как токсины, сидерофоры, пигменты или антибиотики [56]. Основной особенностью NRPS является то, что они представляют собой многофункциональные комплексы, которые создают специфические белковые матрицы для независимого от рибосом биосинтеза низкомолекулярных пептидов разнообразной структуры и широкого спектра биологической активности [55]. Каждый модуль NRPS состоит из трёх основных доменов: аденилирующего (А) домена, который выбирает соответствующую аминокислоту, активирует её как аминокислотаденилат и переносит её в Т домен (также известный как белок-переносчик пептидов, или PCP), где образуется тиоэфирная связь; конденсационного (С) домена, отвечающего за образование пептидной связи между аминокислотой, присутствующей на Т-домеине того же модуля, и пептидным интермедиатом, связанным с Т-домеином предыдущего модуля, и самим Т-домеином [54].

Важно отметить, что процесс биосинтеза на базе NRPS происходит N-концевого участка к С-концевому участку аминокислотных остатков. При этом, как было описано ранее, нерибосомальные пептиды могут приобретать различную пространственную структуру (линейные, циклические или циклически-разветвленные) [13, 55, 57]. Белковые продукты регуляторных генов, входящих в состав БГК, обуславливают тонкую настройку и особенности экспрессии конкретных метаболитов [13, 55].

1.2. Молекулярно-генетические основы регуляции биосинтетических генных кластеров в штаммах актиномицетов

Как было описано ранее, основной прорыв в поиске малоизвестных антибактериальных молекул был сделан благодаря активному использованию компьютерно-вычислительных методов. Анализ большого числа нуклеотидных последовательностей секвенированных генов актиномицетов позволил сформулировать вывод о кодирующей емкости актиномицетов [58]. Было выявлено, что при рутинной культивации реализуется только 5% от всего

биосинтетического потенциала бактериальных изолятов, способных синтезировать антибиотики, а остальная масса БГК находятся в «молчащем» состоянии.

Основное внимание исследователей направлено на оптимизацию путей активации «темной материи» БГК актиномицетов, в качестве методик выступают: использование транскрипционных факторов, действующих на регуляторные области БГК (ионы металлов или иных компонентов среды), а также методы геномного редактирования, для введения точечных мутаций в кодирующие области антибиотиков [59].

1.2.1. Регуляция биосинтеза вторичных метаболитов посредством транскрипционных факторов

Стрептомицеты и родственные актиномицеты характеризуются тем, что синтез вторичных метаболитов при культивации на плотных средах обычно происходит в момент развития воздушного мицелия. При глубинном культивировании этот процесс, как правило, ограничен стационарной фазой роста и часто связывается с ограничением питательных веществ. Как было описано ранее, гены кодирующие вторичные метаболиты организованы в биосинтетические кластеры, размеры которых достигают до 100 т.п.о. [60, 61].

Большинство БГК содержат гены, кодирующие специфические регуляторные белки, обуславливающие экспрессию генов ряда вторичных метаболитов, синтезируемых данным штаммом. Как например ген *bld* необходим для формирования воздушного мицелия [62, 63].

Биосинтез вторичных метаболитов, к которым относится подавляющее большинство антибиотиков, жестко скоординирован с жизненным циклом актинобактерий. Как было установлено, максимальная активность этого процесса наблюдается не в фазе экспоненциального роста, а на более поздних этапах развития культуры – в стационарной и, особенно, в пост-стационарной фазе. Физиологическая причина этой закономерности состоит в фундаментальном переключении клеточного метаболизма в условиях стресса, вызванного истощением ключевых нутриентов в питательной среде (источников углерода, азота, фосфатов). Замедление темпов роста и деления запускает сложную каскадную регуляцию, направленную не на биомассу, а на выживание и конкурентное преимущество.

Центральную роль в этом глобальном перепрограммировании клетки играют уникальные сигнальные молекулы – алармоны, в частности, гуанозинтетрафосфат и гуанозинпентафосфат, объединяемые под общим названием (p)ppGpp. Накопление этого «сигнала голодания» происходит в результате активации рибосом-ассоциированной синтетазы RelA, которая

реагирует на появление в рибосоме незаряженных тРНК (прямого индикатора дефицита аминокислот) [62 - 64]. Повышение внутриклеточной концентрации (p)ppGpp запускает масштабную перестройку транскриптома. Это затрагивает и многочисленные БГК, кодирующие пути синтеза антибиотиков. Классическим примером является регуляция синтеза актинородина у *S. coelicolor*. Высокий уровень (p)ppGpp напрямую активирует промотор гена-регулятора *actII-ORF4*, который, в свою очередь, является ключевым транскрипционным активатором всего БГК актинородина. Это приводит к резкому увеличению продукции данного антибиотика [65, 66]. Аналогичный механизм демонстрируется и у других актиномицетов. Так, у *S. clavuligerus* синтез цефамицина C также находится под строгим контролем. Накопление (p)ppGpp инициирует каскад, приводящий к активации специфических регуляторов (например, продукта гена *ccaR*), которые связываются с промоторами генов БГК цефамицина, запуская их экспрессию [65, 66].

Молекулярный механизм регуляторной функции (p)ppGpp заключается в его прямом аллостерическом взаимодействии с РНК-полимеразой бактерий. (p)ppGpp специфически связывается с участком между β' - и ω -субъединицами фермента. Это связывание индуцирует крупные конформационные перестройки в структуре РНК-полимеразы, что существенно изменяет ее аффинность и специфичность к различным промоторам [67]. В результате данных изменений происходит масштабное репрограммирование транскрипции: подавляется экспрессия генов, ассоциированных с активным ростом и биосинтезом макромолекул (таких как гены рибосомальных РНК и белков), и, напротив, активируются промоторы, контролируемые гены стрессового ответа и вторичного метаболизма [66]. Таким образом, (p)ppGpp действует как глобальный молекулярный переключатель, который физически перенастраивает транскрипционный аппарат клетки, делая его более восприимчивым к промоторам БГК антибиотиков.

Таким образом, (p)ppGpp выступает в роли магистрального молекулярного переключателя, который интегрирует сигналы о нарушении гомеостаза и трансформирует их в мощную активацию программ по производству антибиотиков, обеспечивая выживание вида в условиях жесткой конкуренции.

Параллельно с системой (p)ppGpp существует другой ключевой механизм регуляции, опосредованный внеклеточными сигнальными молекулами. Ярким примером служит γ -бутиролактоновая система кворум-сенсинга, широко распространенная у актиномицетов. У *S. griseus* данный механизм реализуется через А-фактор (2-изокаприлоил-3R-гидроксиметил- γ -бутиролактон) [68 - 70]. Схематическое описание регуляции А-фактором генов биосинтеза стрептомицина в клетках *S. griseus* представлено на Рисунке 1.4.

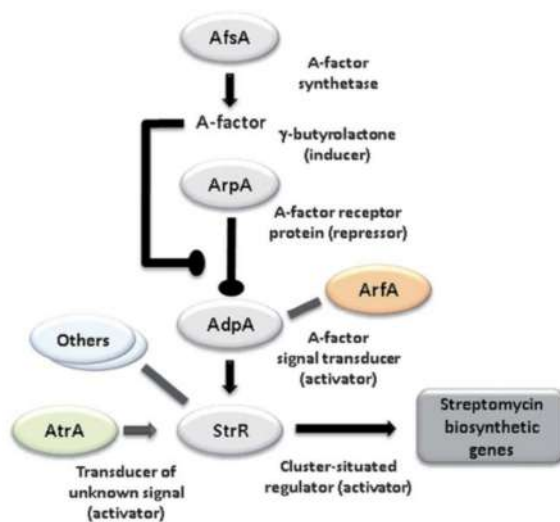


Рисунок 1.4 – Схема регуляции А-фактором генов биосинтеза стрептомицина в клетках *S. griseus* [70]

Его синтез зависит от клеточной плотности и катализируется ферментом AfsA-синтетазой. После достижения пороговой концентрации в среде, А-фактор диффундирует обратно в клетку, где специфически связывается с репрессорным рецепторным белком (ArpA). Это связывание вызывает диссоциацию репрессора с ДНК, что приводит к дерепрессии гена-регулятора *adpA*. Белок AdpA, в свою очередь, активирует каскад транскрипции, запуская одновременно и морфологическую дифференциацию (образование воздушного мицелия и спор), и экспрессию БГК стрептомицина, координируя таким образом процесс репродукции с производством антибиотика [70].

Помимо глобального контроля через сигнал голодания (p)ppGpp, биосинтез антибиотика актинородина у *S. coelicolor* находится под четким управлением системы из двух противоположно действующих регуляторов – репрессора AbsA2 и активатора AtrA (Actinorhodin Transcription Regulator A), которые образуют сложный переключающий механизм, интегрирующий внутриклеточные сигналы [71]. Описание регуляции синтеза антибиотика актинородина в клетках *S. coelicolor* посредством репрессора AbsA2 и активатора AtrA показано на Рисунке 1.5.

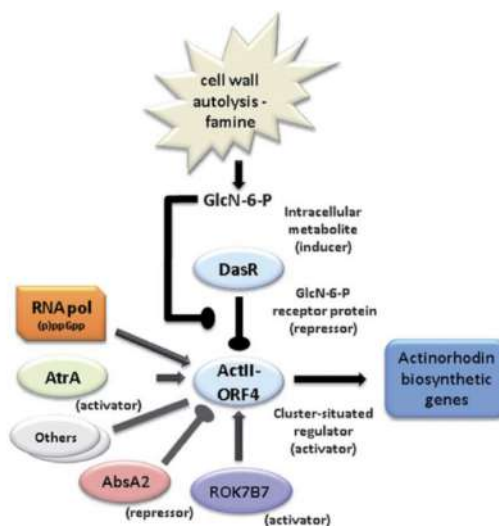


Рисунок 1.5 – Схема регуляции синтеза антибиотика актинородина в клетках *S. coelicolor* посредством репрессора AbsA2 и активатора AtrA [71]

Негативная регуляция через киназный каскад AbsA2 происходит следующим образом. Система AbsA2 представляет собой классический пример двухкомпонентной сигнальной системы. Белок AbsA2 является регуляторным компонентом, активность которого опосредуется киназой AbsA1. В ответ на определенные стрессовые стимулы происходит фосфорилирование остатка серина в молекуле AbsA2. Это фосфорилирование не инактивирует репрессор, а, повышает его сродство к специфическим сайтам связывания в промоторной области гена-регулятора *actII-ORF4*. Связывание фосфорилированного AbsA2 с ДНК блокирует доступ РНК-полимеразы, эффективно подавляя транскрипцию всего биосинтетического кластера актинородина [72, 73]. Таким образом, система AbsA1/AbsA2 действует как предохранительный выключатель, предотвращающий энергозатратный синтез антибиотика в неблагоприятных условиях.

Позитивная регуляция осуществляется через активатор AtrA. Противовесом репрессорному механизму служит активатор AtrA. Его роль подтверждается генетическими экспериментами: у штаммов с делецией гена *atrA* наблюдается резкое снижение или полное отсутствие синтеза актинородина, в то время как сверхэкспрессия *atrA*, напротив, приводит к значительному увеличению выхода антибиотика. AtrA представляет собой транскрипционный фактор, который связывается непосредственно с промотором ключевого гена-регулятора *actII-ORF4*. Это связывание облегчает инициацию транскрипции, возможно, за счет рекрутирования РНК-полимеразы или изменения конформации ДНК, что в конечном итоге запускает каскад экспрессии всех структурных генов кластера актинородина [71]. Таким образом, синтез актинородина, определяется динамическим балансом между этими двумя силами: активация

через AtrA, что стимулирует экспрессию гена *actII-ORF4*; Репрессия через фосфорилированный AbsA2, приводящая к подавлению экспрессии гена *actII-ORF4*.

Предполагается, что различные условия окружающей среды и метаболитические сигналы могут смещать этот баланс, влияя на активность киназы AbsA1 и/или на экспрессию самого гена *atrA*. Такая двухконтурная система обеспечивает точную и надежную регуляцию, позволяя клетке синтезировать антибиотик только тогда, когда для этого созданы оптимальные внутренние условия, и энергетические затраты будут оправданы с точки зрения выживания популяции.

Регулирующим действием на биосинтез генов вторичного метаболизма обладают и ионы двухвалентных металлов, а именно ионы цинка и железа. Цинк является важным микроэлементом, являющийся компонентом ферментов и структурных белков. У большинства актиномицетов гены, кодирующие систему захвата цинка, находятся под контролем Znr – цинк-чувствительного транскрипционного репрессора [74, 75]. Данная последовательность может располагаться в пределах промоторной области различных БГК, например в клетках *S. coelicolor* это БГК коелибактина. Повышение внутриклеточной концентрации ионов цинка приводит к подавлению синтеза коелибактина в клетках *S. coelicolor* [64]. Ионы железа также могут выступать в роли регуляторных факторов и подавлять гены метаболизма железа.

Синтез вторичных метаболитов, в частности антибиотиков, у актиномицетов представляет собой энергетически затратный процесс, который жестко координируется с доступностью питательных ресурсов. Физиологически это проявляется в том, что активный биосинтез антибиотиков ингибируется в богатых питательных средах и запускается только в условиях нутриентного стресса, например, при истощении источников углерода, азота или фосфатов. Ярким примером такой регуляции является подавление синтеза антибиотиков под действием N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) – мономера хитина и компонента клеточной стенки бактерий. Культивирование актиномицетов, в том числе *S. coelicolor*, в средах, обогащенных GlcNAc, приводит к полному ингибированию как роста, так и синтеза ключевых вторичных метаболитов [76]. Схема регуляции генов биосинтеза вторичных метаболитов в клетках *S. coelicolor* в условиях избытка питательных веществ и добавления N-ацетилглюкозамина представлена на Рисунке 1.6.

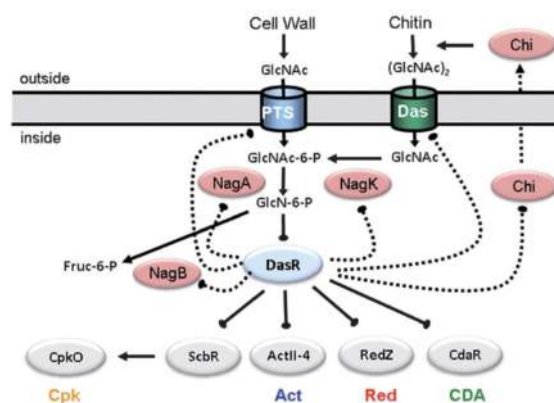


Рисунок 1.6 – Схема регуляции генов биосинтеза вторичных метаболитов в клетках *S. coelicolor* в условиях избытка питательных веществ и добавления N-ацетилглюкозамина [71]

Молекулярный механизм этого феномена опосредован транскрипционным фактором DasR – ключевым регулятором, интегрирующим сигналы углеродного и азотного метаболизма. Экспрессия и активность DasR напрямую зависят от наличия GlcNAc в среде. При поступлении GlcNAc в клетку он преобразуется в N-ацетилглюкозамин-6-фосфат (GlcNAc-6-P), который выступает в роли молекулярного эффектора. Связывание GlcNAc-6-P с DasR индуцирует конформационные изменения белка, значительно повышающие его аффинность к специфическим сайтам связывания в промоторных регионах ДНК [76, 77]. Активированный комплекс DasR-GlcNAc-6-P специфически связывается с так называемыми DasR-чувствительными элементами в промоторах БГК. Например, при связывании с промоторной областью гена-регулятора гена *actII-ORF4*, контролирующего кластер актинородина, DasR стерически блокирует посадку РНК-полимеразы, что полностью подавляет инициацию транскрипции и, как следствие, синтез антибиотика [76 - 78].

Важно отметить, что DasR действует как глобальный репрессор синтеза антибиотиков. Помимо БГК актинородина, он с высокой аффинностью связывается с промоторами кластеров, кодирующих синтез других антибиотиков, таких как продигозин (красный пигмент, обладающий антибиотической активностью) и кальций-зависимого антибиотика (CDA). Таким образом, через единый механизм – наличие легкодоступного источника углерода и азота (GlcNAc) – «отключает» экспрессию генов, ответственных за производство различных вторичных метаболитов. Физиологический смысл этой системы заключается в оптимизации энергетических затрат. Клетка «понимает» через сигнал GlcNAc, что находится в среде, богатой ресурсами, подходящими для быстрого роста и деления. В таких условиях энергетически невыгодно синтезировать сложные антибиотики. И наоборот, исчезновение GlcNAc-сигнала снимает репрессию с промоторов, позволяя запустить программу антибиогенеза для конкурентной борьбы в условиях голодания [76 - 78].

Таким образом, исследование регуляции синтеза вторичных метаболитов у актиномицетов, синтезирующих антибиотики, позволяют раскрывать новые стратегии активации синтеза антибиотиков, а это в свою очередь позволит более эффективно использовать богатый арсенал природных соединений, закодированных в их геномах. Применение методов полногеномного анализа вносят значительный вклад в системное понимание биологии стрептомицетов. Полученные знания раскроют дополнительные возможности манипулирования регуляцией генов для активации экспрессии "молчащих" антибиотических кластеров, которые остаются невыявленными в условиях лабораторного скрининга.

1.2.2. Сайт-направленный мутагенез

Генетическая инженерия актиномицетов играет важную роль в рациональной разработке генно-модифицированных штаммов и повышении продукции вторичных метаболитов [79]. Однако из-за обширных морфологических различий этой группы микроорганизмов необходимо разработать и адаптировать методологии и эффективные инструменты генной инженерии. Ключевыми препятствиями в разработке генетических методов для клеток актиномицетов являются:

- 1) Отсутствие подходящих векторов для клонирования и переноса генетического материала;
- 2) Невозможность введения ДНК в клетку через толстый барьер клеточной стенки и ограничения для экзогенной ДНК;
- 3) Неэффективная экспрессия генов экзогенной ДНК из-за высокого содержания GC пар в организме-хозяине. Несмотря на вышеописанные препятствия, исследования в этой области ведутся и с каждым годом пополняется база эффективных генно-инженерных техник.

Исследования в этой области микробиологии не перестают останавливаться, поскольку согласно устоявшейся концепции, выдвинутой в 2019 году, нарушение синтеза консервативных БГК известных антибиотиков, позволяет детектировать метаболитов, обладающих слабой активностью, но могут выступать в качестве потенциально нового антимикробного метаболита с ранее неизвестной мишенью или неописанными свойствами [80, 81]. Из предыдущего тезиса вытекает основная задача генно-инженерных манипуляций над геномами актиномицетов, а именно введение точечных мутаций или делеций в биосинтетический аппарат антибиотиков. В данном обзоре уделяется внимание трем направлениям, синонимичным фундаментальным

клеточным процессам: 1) гомологичная рекомбинация, используемая в PCR-Targeting System; 2) сайт-специфическая рекомбинация, применяемая в системах Cre-*loxP* и pSAM2; 3) индукция двуцепочечных разрывов (DSBs) ДНК с помощью нуклеаз, таких как мегануклеаза I-SceI или нуклеазы Cas (системы CRISPR/Cas). Схематическое описание трех направлений внесения мутаций в БГК актиномицетов отражено на Рисунке 1.7.

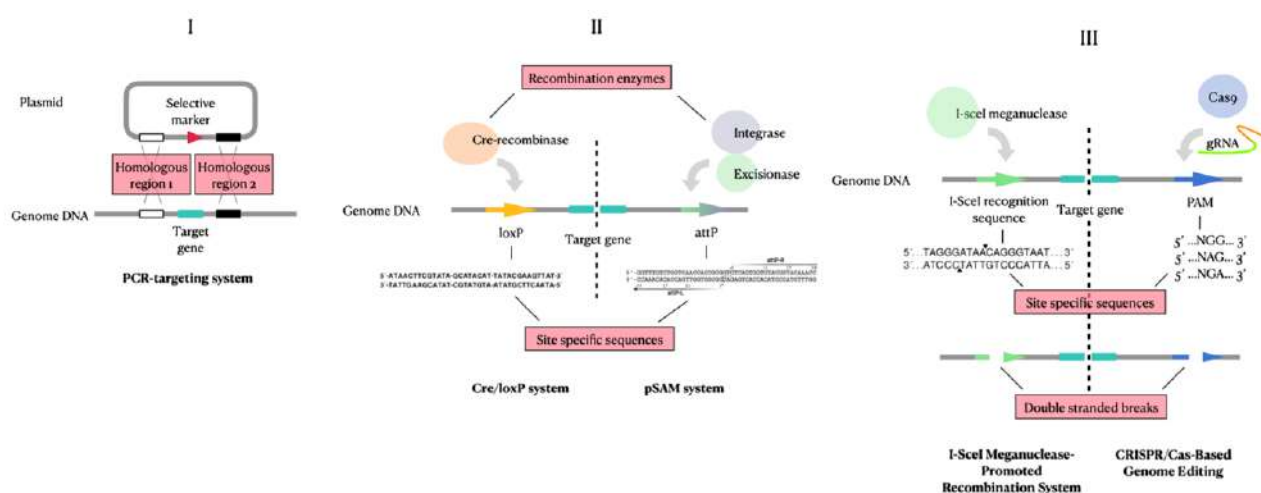


Рисунок 1.7 – Схема молекулярных механизмов, лежащих в основе генно-инженерных методов для введения мутаций в геном клеток актиномицетов: I) Гомологичная рекомбинация; II) Сайт-специфическая рекомбинация; III) Действие нуклеаз, приводящих к двухцепочечным разрывам, с последующим их восстановлением [8, 82]

ПЦР-опосредованная система редактирования генома базируется на явлении гомологичной рекомбинации благодаря наличию генов λ -Red бактериофага λ , который присутствует в форме профага в клетках некоторых *E. coli* [83]. Процесс осуществляется посредством генов рекомбинации, кодируемых бактериофагом λ – гены *exo* и *bet* кодируют двухцепочечную экзонуклеазу 5'-3' (Ехo), и белок отжига одноцепочечной ДНК, Beta, которые вместе могут повторно объединить двухцепочечный ПЦР продукт, окаймленный короткими фланкирующими последовательностями в желаемую генетическую мишень. Кроме того, бактериофаг λ кодирует ген *gam*, продуктом которого является белок Gam, обладает ингибирующим действием на аппарат рекомбинации RecBCD в бактериальной клетке, который в противном случае будет деградировать линейную ДНК, введенную в бактериальную клетку [84, 85]. Схематическое описание молекулярного механизма ПЦР-опосредованного редактирования генома представлено на Рисунке 1.8.

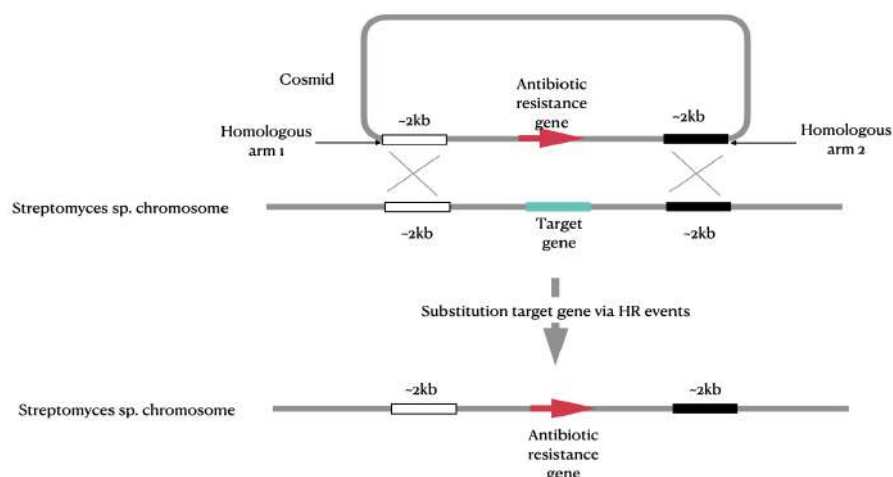


Рисунок 1.8 – Схема внесения мутаций в геном актиномицетов с помощью ПЦР - опосредованного метода геномного редактирования [8]

Данная технология была апробирована на штаммах актиномицетов, а именно в отношении кластера биосинтеза геосмина *S. coelicolor* A3(2). Для этого использовался плазмидный вектор с маркером селекции, компонентами λ -Red и участками гомологии. Благодаря этому подходу впервые удалось получить делетированный мутант *S. coelicolor* A3(2) по геосминовому БГК [70, 72]. Помимо этого, данная методика получила положительный результат в отношении эндогенных метаболитов авермектина и филипина в штамме *S. avermitilis* и участков транспозонов [86] и IS-последовательностей [87]. Последние мутации могут приводить к стабильности генома. К недостаткам можно отнести не универсальность метода в отношении ряда штаммов актиномицетов [88, 89].

Метод Cre-*loxP* используется для внесения крупнонуклеотидных делеций в геном бактериальных клеток [90,91]. Первоначально данная система была выявлена и подробно охарактеризована на умеренном бактериофаге P1 [91]. Основным участником данного процесса выступает рекомбиназа Cre, представляющая собой белок размером 38 кДа, ключевая задача которого произвести сайт-специфическую рекомбинацию на участке длиной 34 п.о. именуемым сайтами *loxP* (локус кроссинговера [x] в бактериофаге P1) [92, 93]. Схематическое описание метода Cre-*loxP* представлено на Рисунке 1.9.

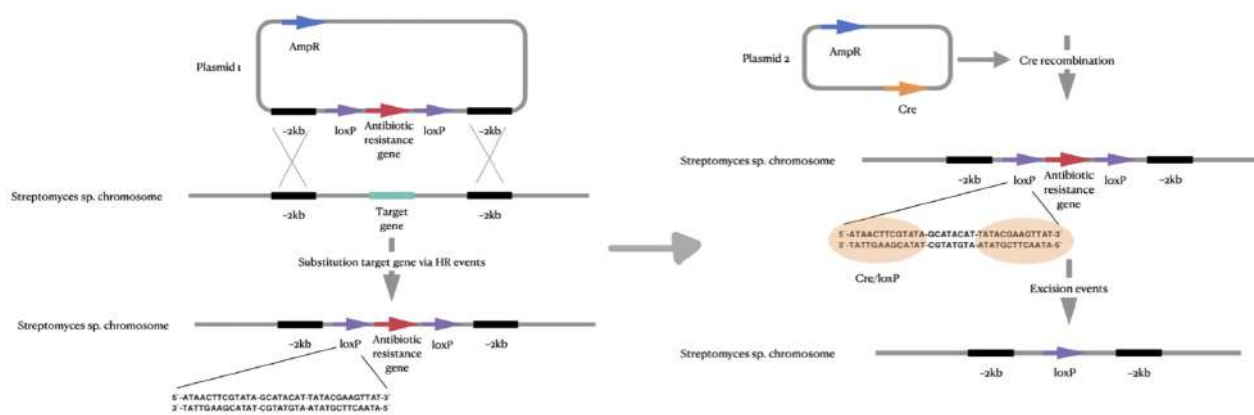


Рисунок 1.9 – Схема внесения мутаций в геном актиномицет Cre/loxP - опосредованным методом геномного редактирования [8]

Рекомбинация, опосредованная Cre, между двумя сайтами *loxP* приводит к взаимному обмену цепями ДНК между этими сайтами, но дает разные общие продукты, которые зависят от ориентации и расположения двух последовательностей. Когда два сайта *loxP* находятся в одинаковой ориентации на линейной молекуле ДНК, событие внутримолекулярной рекомбинации, опосредованное рекомбиназой Cre, разрешается с вырезанием фланкированной *loxP* последовательности ДНК в виде кольцевой молекулы, и на каждом продукте реакции остается один сайт *loxP* [94].

Если два сайта *loxP* находятся на отдельных линейных последовательностях ДНК, то посредством события межмолекулярной рекомбинации Cre опосредует взаимный обмен (транслокацию) фланкирующих последовательностей. Наконец, когда два сайта *loxP* находятся на одной молекуле ДНК в противоположной ориентации относительно друг друга, посредством события внутримолекулярной рекомбинации Cre опосредует инверсию фланкированной последовательности [93 - 95].

С помощью этой системы рекомбинации были успешно проведены генетические манипуляции на клетках млекопитающих, растений, дрожжей и бактерий, в том числе стрептомицетов на клетках *S.s avermitilis* [89]. Система Cre-*loxP* была нацелена на БГК геосмина для делеции участка длиной 1400 т.п.о.

Основные достоинства метода – это специфичность благодаря сайтам *loxP* и точность процесса за счет рекомбиназы Cre [96].

Ранее было описано, что многие штаммы актиномицетов обильно продуцируют природными плазмидами кольцевой или линейной топологии, ассоциированные с терминальными участками хромосомы или в формате самостоятельно реплицирующихся эписом [45, 46]. Так, в клетках *S. ambofaciens* ATCC23877 впервые был выделен и описан плазмидный вектор pSAM, размер которого составляет 11 т.п.о. [97]. Данная конструкция применяется в качестве инструмента для

геномного редактирования на базе фундаментального процесса сайт-специфической гомологичной рекомбинации. Система pSAM характеризуется способностью интегрировать в геном штаммов по специфичным attachment сайтам (*att*) посредством кодируемой геном *int* интегразы [98]. Схематичное описание системы на основе плазмидного вектора pSAM отражено на Рисунке 1.10.

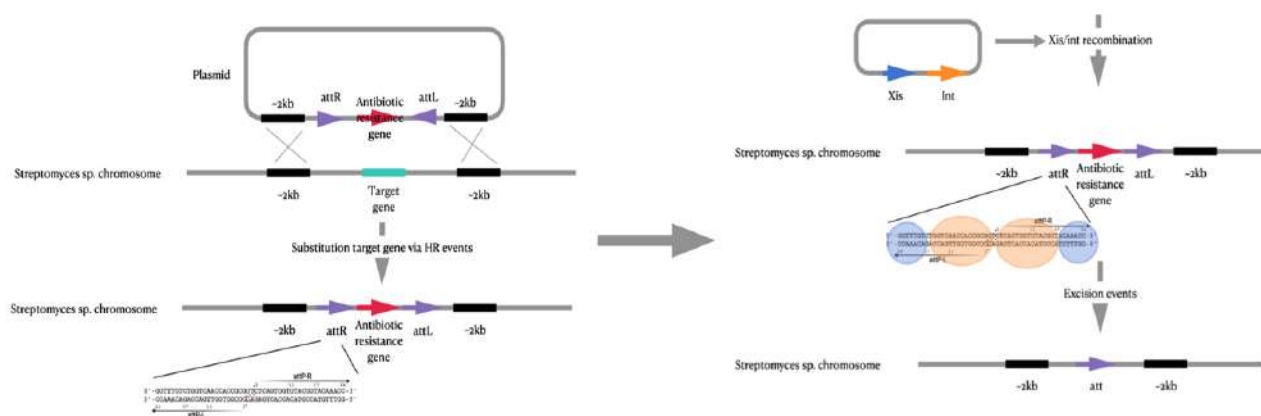


Рисунок 1.10 – Схема внесения мутаций в геном актиномицетов pSAM - опосредованным методом геномного редактирования [8]

Процесс включает в себя последовательные акты гомологичной рекомбинации по специфичным сайтам *attP/attB* между плазмидным вектром pSAM, несущим маркер селекции и геномной ДНК бактерии. Специфические участки должны окаймлять нуклеотидную последовательность интереса и селективный маркер для осуществления замены в клетках *Streptomyces* [99 - 101]. После положительного отбора мутантных штаммов кассета устойчивости может быть эффективно удалена путем временной экспрессии генов *xis* и *int*, кодируемых на временной плазмиде. Данная система не требует оптимизации кодонов, берет свое начало из клеток актиномицетов и может быть применена на редких представителях филума *Actinomycetota*, примером может выступать штамм *Amycolatopsis mediterranei* DSM 40773, на котором удалось провести делецию целого БГК рифампицина длиной 90 т.п.о [97].

Негативной стороной технологии может выступать рубцы размером 33 – 35 п.о. после эксцизии одного из *att* сайтов, что может приводить к сдвигу рамки считывания.

Система редактирования генома на основе I-SceI (Meganuclease-Promoted Recombination System) первоначально была изучена на клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и представляет собой эндонуклеазу, состоящую из 235 аминокислотных остатков, кодируемую мобильным интроном группы I гена 28С рРНК [102]. Это семейство ферментов опосредует распространение своих генов, разрезая безинтронные аллели, тем самым создавая

рекомбинирующие концы для дупликации интронов, в которых расположены гены эндонуклеаз [103].

Основной механизм действия подобен типичным эндонуклеазам, а именно внесение двухцепочечных разрывов в молекулу ДНК, но они отличаются от рестриктаз типа II благодаря распознаванию относительно длинных нуклеотидных последовательностей порядка 12–40 п.о. [104]. У бактерий двухцепочечный разрыв хромосомы является летальным событием, если повреждение не восстанавливается в ходе гомологичной рекомбинации.

Редактирование генома штаммов актиномицетов происходит посредством двух плазмидных векторов, один из которых несет последовательность для экспрессии белка эндонуклеазы I-SceI, а второй вектор кодирует сай-специфические участки, состоящие из 18 нуклеотидов для I-SceI нуклеазы [105, 106]. Схематическое описание механизма сайт-направленного мутагенеза на основе I-SceI мегануклеазы отражено на Рисунке 1. 11.

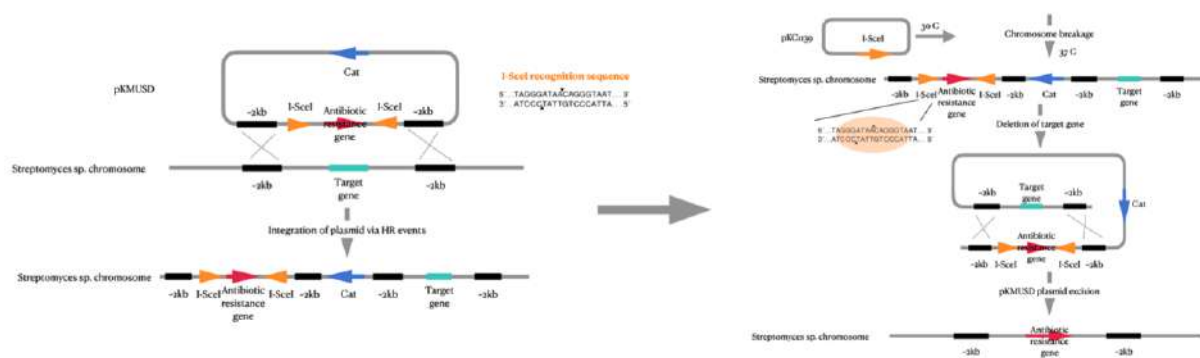


Рисунок 1.11 – Схема внесения мутаций в геном актиномицетов I-SceI - опосредованным методом геномного редактирования [8]

Процесс был проведен на штамме *S. venezuelae* для делеции геномного кластера актинородина. Процесс включает последовательные акты введения двухцепочечного разрыва в специфичной последовательности и последующее восстановление за счет гомологичной рекомбинации [102].

Несмотря на позитивные результаты в отношении ряда штаммов актиномицетов, ключевыми недостатками являются мутации опосредованные аппаратом рекомбинации в ходе восстановления двухцепочечных разрывов от действия I-SceI мегануклеазы.

Технология CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats ассоциированной с нуклеазой Cas9) представляет собой адаптивную иммунную систему многих бактерий и архей, в которых РНК, содержащие «спейсерную» последовательность от ранее

подвергшихся воздействию бактериофагов, помогают белкам-эндонуклеазам Cas распознавать и расщеплять специфическую экзогенную ДНК [107 - 109]. Поскольку система CRISPR/Cas демонстрирует более высокую специфичность и точность при распознавании последовательностей мишеней, она стала отличным выбором для нацеленного редактирования генома [110 - 112].

Система CRISPR/Cas II типа, изначально использует CRISPR РНК (crRNA) и транскрипционную crRNA (tracrRNA) для формирования дуплекса crRNA-tracrRNA, где tracrRNA выступает в качестве скаффолда для белка Cas9 [113, 114], crRNA обеспечивает связывание с целевой последовательностью, тем самым помогая нуклеазе Cas9 распознавать и расщеплять целевую ДНК, содержащую тринуклеотидный мотив, прилегающий к протоспейсеру (PAM), и 5'-конец из 20 нуклеотидов, комплементарный спейсерам [115, 116]. Для стабильности и универсальности отдельно транскрибируемых crRNA-tracrRNA РНК авторами системы было произведено сшивание двух РНК (crRNA и tracrRNA) в синтетическую одинарную направляющую РНК (sgRNA), что значительно расширяет применение системы CRISPR/Cas9 [116]. Существуют вариации белков Cas для предотвращения off-target эффекта на штаммах с высоким содержанием GC-пар в геноме.

Одной из ключевых последовательностей для разрезания мишени является наличие тринуклеотидной PAM последовательности, так, например для Cas9 белка из *Streptococcus pyogenes* необходима G-обогащенная последовательность (5'NGG 3'), а для Cas12 белка из *Francisella novicida* T-обогащенная последовательность (5' TTN 3'), которая значительно более эксклюзивная для штаммов с высоким % GC пар в геноме [43, 115, 117, 120, 121]. Схематическое описание молекулярного механизма внесения мутаций в БГК актиномицетов изображено на Рисунке 1.12.

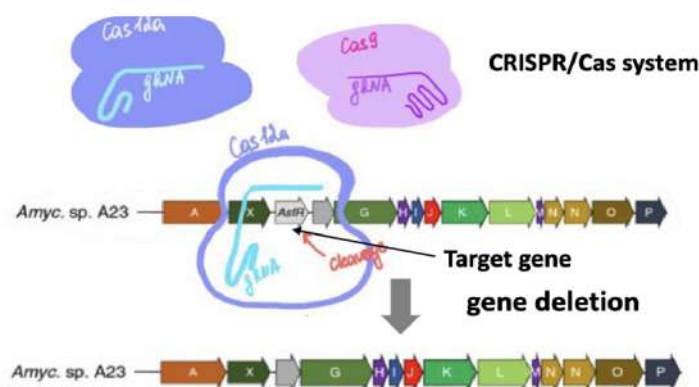


Рисунок 1.12 – Схема внесения мутаций в геном актиномицетов CRISPR-Cas – опосредованным методом геномного редактирования [8]

Процесс введения мутаций в геном происходит по модели I-Sec нуклеазы, где система специфически генерирует двухцепочечный разрыв в целевом сайте с помощью нуклеазы Cas9 под управлением sgRNA, содержащей специально разработанный спейсер [8, 43]. Затем восстанавливает полученный разрыв хромосомы с помощью системы гомологично-зависимой репарации в присутствии матрицы для репарации, внося хромосомные делеции размером от 20 п.н. до 31 т.п.о. с эффективностью 70-100% [122, 123].

Данная система дала наибольший прорыв в вопросе поиска новых природных метаболитов из ранее охарактеризованных штаммов актиномицетов и подтвердила гипотезу о том, что масса новых продуктов маскируются на фоне более активных известных метаболитов. Таким образом, было продемонстрировано, что делеция консервативного БГК стрептомицина в геноме штамма, посредством системы CRISPR/Cas9 приводила к продукции новых антибиотиков с новыми мишенями действия: тиолактомицин (ингибитор биосинтеза жирных кислот), амицетин, фенантровиридин, 5-хлор-3формилиндола для последних трех мишеней не выявлена [124, 125].

Важно отметить, что изменение метаболических путей БГК может быть достигнуто не только непосредственным удалением фрагментов генов, но и мутациями в регуляторных участках БГК. Так, например, усиление промоторных областей нерибосомальных пептидных синтетаз могут приводить к активации всех участников метаболического пути антибиотиков. Такая промоторная инженерия была проделана в отношении штамма *S. viridochromogenes*, что привело к синтезу нового циклического поликетидного антибиотика [126].

Как было отмечено ранее, недостаток системы на основе белка Cas9 связан с off-target эффектом из-за особенностей геномного контента [127 - 129]. Поэтому альтернативный вариант редактирования генома базируется на белке Cas12a (Cpf1-нуклеаза), ввиду распознавания уникального протоспейсера (5' TTN 3'), что значительно снижает неспецифичную активность фермента и последующие мутации [130, 131]. Отличным примером применимости системы на основе CRISPR/Cas12a служит генетические манипуляции в отношении БГК 5-оксомилбемицин A3/A4 штамма *S. hygroscopicus* SIPI-KF [132].

На сегодняшний день система CRISPR/Cas используется повсеместно и позволяет производить генетические мутации в отношении представителей трех доменов жизни, благодаря своей универсальности, эффективности и специфичности. Разумеется, существуют и недостатки, описанные ранее, но в сравнении с другими вариантами генетических технологий (ПЦР-опосредованный подход, Cre/loxP, pSAM и I-Sec системы) CRISPR/Cas показала эффективность в вопросах идентификации новых метаболитов.

Таким образом, анализ литературных данных демонстрирует, что актиномицеты представляют собой уникальный эволюционный резервуар генов биосинтеза антибиотиков и

детерминант множественной лекарственной устойчивости. Современные биоинформатические подходы позволили установить, что в геномах актиномицетов закодировано значительно больше биосинтетических кластеров, чем реализуется в стандартных лабораторных условиях. Однако остаются недостаточно изученными молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции экспрессии этих кластеров, а также эволюционные пути формирования резистомов у непродуцирующих представителей филума. Это определяет необходимость комплексного исследования, сочетающего выделение новых штаммов из природных источников, анализ их генетического потенциала и изучение регуляторных механизмов, контролирующих синтез вторичных метаболитов. В связи с этим в рамках настоящей работы были поставлены задачи по выделению и всестороннему анализу штаммов актиномицетов, обладающих различными фенотипическими свойствами, включая образцы с множественной лекарственной устойчивостью и продуцирующей способностью антибиотиков

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и приборы

2.1.1. Питательные среды

LB: 1 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1% NaCl.

LB-агар: 1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% бакто-агар.

SOB: 2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 2% бакто - агар, pH 7,0.

SOC: 2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 20 мМ глюкоза, pH 7,0.

Минеральный агар 1: 2% крахмал растворимый, 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% KNO_3 , 0,05% NaCl, 0,001% $FeSO_4$, 2% бакто-агар, pH 7,2-7,4.

ГАК/глюкозно-аспарагиновый агар: 1% глюкоза, 0,05% аспарагин, 0,05% K_2HPO_4 , 2% бакто-агар, pH 6,8-7,0.

Органический агар 79: 1% глюкоза, 1% бакто-пептон, 0,2% дрожжевой экстракт, 0,2% экстракт казеина, 0,6% NaCl, 2% бакто-агар, pH 7,0-7,2.

ISP2: 0,4% дрожжевой экстракт, 1% солодовый экстракт, 0,4% глюкоза, 2% бакто-агар. pH 7,0-7,2.

ISP3: 5% овсяные хлопья/2,5% овсяной муки, 0,5% кормовой мел, 2% бакто-агар.

ISP4: 1% крахмал растворимый, 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% NaCl, 0,2% $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% $CaCO_3$, 2% бакто-агар. pH 7,0-7,2.

ISP5: 0,1% L-asparagine, 1% глицерин, 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% terace salts solution (мл), 2% бакто-агар. pH 7,0-7,2.

ISP6: 1,5% пептон бактериальный, 0,5% гидролизат казеина, 0,05% цитрат железа, 0,1% K_2HPO_4 , 2% бакто-агар. pH 7,0-7,2.

ISP7: 15% глицерин, 0,05% L-tyrosine (Difco), 0,1% L-asparagine (Difco), 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05% NaCl, 0,001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% terace salts solution (мл), 2% бакто - агар. pH 7,0-7,2.

TSB: 1,7% гидролизат казеина, 0,3% соевый пептон, 0,5% NaCl, 0,25% K_2HPO_4 , 0,25% глюкоза, 2% бакто - агар.

MS: 2% соевая мука, 2% маннитол, 2% бакто-агар.

R2: 10,3% сахара, 0,025% K₂SO₄, 0,2% KH₂PO₄, 1,012% MgCl₂*6H₂O, 0,295% CaCl₂*2H₂O, 10% глюкоза, 0,3% L-пролин, 0,01% касаминовые кислоты, 0,025M TES-буфер, 2% бакто-агар, pH 7,0-7,2.

M3: 0,24% растворимый крахмал, 0,01% глюкоза, 0,03% говяжий экстракт, 0,05% дрожжевой экстракт, 0,05% бакто-триптон, 1,5% бакто-агар, 0,35% L-пролин, 8% сахара, 1мМ MgCl₂, 5 мМ CaCl₂.

2xYT: 1,6% бакто-триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl,

MG-1: 1% глюкоза, 0,4% пептон, 0,2% дрожжевой экстракт, 0,2% говяжий экстракт, 0,4% глицин.

S27M: 7,32% маннитол, 0,5% бакто-пептон, 0,3% дрожжевой экстракт, 2% бакто-агар.

ГПДА: 2% глюкоза, 2% бакто-пептон, 1% дрожжевой экстракт, 2% бакто-агар.

Среды стерилизовали автоклавированием при 1 атм 30 мин и при 0,5 атм для сред, содержащих глюкозу и другие сахара.

2.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе были использованы штаммы *E. coli*, указанные в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Штаммы *E. coli*

Штамм	Генотип	Описание
Ec135	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻ Δdam Δdcm Δhsd ΔmcrBC ΔmcrA Δmrr</i>	Штамм имеет делеции генов метилаз <i>Δdam Δdcm</i> , что позволяет устранить конфликт в системе рестрикции-у бактерий разных родов.
pUZ8002/ ET12576	(Paget et al., 1999) <i>F- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44</i>	Используется для проведения генных манипуляций в клетках <i>Streptomyces</i> посредством конъюгативного переноса плазмидных векторов. Помимо этого, штамм имеет делецию генов метилаз <i>Δdam Δdcm</i> , что позволяет устранить конфликт в системе рестрикции-модификации у бактерий разных родов.
JW5503 ΔtolC	<i>F⁻, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔtolC732::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Штамм содержит генетическую конструкцию pDualrep2 (Остерман И.А.) для проведения высокоэффективного скрининга вторичных метаболитов актиномицетов. Кроме того, штамм имеют делецию гена эфлюкса - <i>ΔtolC</i> для повышения чувствительности тест-штамма.

Продолжение Таблицы 2.1

Штамм	Генотип	Описание
BW25113 lptD	<i>lacI⁺rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{АН33} ΔrhaBAD_{LD78} rph-1 Δ(araB– D)567 Δ(rhaD–B)568 ΔlacZ4787(::rrnB-3) hsdR514 rph-1, Δlptd.</i>	Штамм содержит генетическую конструкцию pDualrep2 (Остерман И.А.) для проведения высокоэффективного скрининга вторичных метаболитов актиномицетов. Кроме того, штамм имеет делецию в гене <i>lptD</i> с 330 по 352 для повышения чувствительности тест-штамма.

В работе были использованы штаммы актиномицетов указаны в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Штаммы представителей филума *Actinomycetota*

Штамм	Применение	Продуцируемый метаболит
<i>Amycolatopsis compotoni</i> A23 ^T	Объект для проведения сайт-направленного мутагенеза посредством CRISPR-Cas9 системы.	Тетраценомицин X
<i>Krasilnikoviella flava</i> YrIIa5	Объект для функционально-геномного анализа	--
<i>Streptomyces globisporus</i> bja209	Объект для наработки и скрининга продуцируемого антимикробного соединения.	Албомицин и Дефероксамин E

Для более расширенного определения спектра антимикробного действия для скрининга антивнх компонентов использовали клинически-значимые бактериальные патогены: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* SS01, *S. aureus* (MRSA) INA00761, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* CBS 8836, *Mycobacterium smegmatis* Ac-1171, *K. pneumonia* 59659, *K. pneumonia* 62867, *K. pneumonia* 67704, *K. pneumonia* 86561, *K. pneumonia* 88252, *K. pneumonia* 101073, *K. pneumonia* 105142, *K. pneumonia* ATCC 700603, *Escherichia coli* 61955, *E. coli* 35705, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Acinetobacter baumannii* 95776, *A. baumannii* 92829, *A. baumannii* 105129, *A. baumannii* 100322, *Enterococcus faecium* 99306, *Pseudomonas aeruginosa* 80858, *P. aeruginosa* 79952, *P. aeruginosa* 105295, *P. aeruginosa* 111226, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Векторы, для сборки целевых конструкций и экспрессии вторичных метаболитов, используемые в работе, представлены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Используемые векторы

Название вектора	Гены	Размер, п.о.	Описание
pCRISPomycetes-2	<i>AprmR</i> , <i>sSpCas9</i>	10540	Содержит последовательность гена белка Cas9 и ген направляющей РНК (<i>gRNA</i>), используется для геномного редактирования штаммов <i>Streptomyces</i> .

Продолжение Таблицы 2.3

pAcTransTest	<i>AprmR</i> , <i>k2s</i> , <i>turborfp</i>	7708	Содержит последовательность гена репортёрного белка Katushka2S и TurboRFP под конститутивными промоторами <i>gpsL</i> и <i>gapdh</i> . Используется для оценки эффективности трансформации штаммов <i>Streptomyces</i> .
pDualrep2 (Остерман И.А.)	<i>AmpR</i> , <i>k2s</i> , <i>rfp</i>	3960	Вектор содержит гены репортёрных белков Katushka2S и TurboRFP под промоторами <i>trpL</i> и <i>sulA</i> , индуцируемые антибиотиками в сублетальных концентрациях. Используется для скрининга антимикробных метаболитов штаммов <i>Streptomyces</i> .

2.1.3. Принадлежности

Для выделения плазмидной ДНК использовался фирменный набор LumiSpin® PLASMID (LumiProbe, Россия). Для выделения фрагментов ДНК использовался фирменный набор LumiSpin® UNI Isolation spin Kit for Any Samples (LumiProbe, Россия). Для электротрансформации использовали кюветы с зазором 0,2 см (BioRad, США).

2.1.4. Приборы

Для измерения оптической плотности ДНК и бактериальных клеток использовали Спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Амплификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР с использованием амплификатора Thermal Cycler T100 (BioRad, США). В работе использовали автоклав 2540 МК (Tuttnauer, Израиль); центрифуги Eppendorf 5418R, 5910R (Eppendorf Gerätebau, Германия); термостат Thermo-Shaker TS-100C (Biosan, Латвия), воздушные термостатированные шейкеры Innova 44 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, США). Комплекты оборудования для электрофореза Gel Electrophoresis Cell Model 150 (Bio-Rad, США); источники постоянного тока BioRad PowerPac Basic (Bio-Rad, США).

2.2. Методы микробиологии

2.2.1. Посев и выделение чистых культур актиномицетов

Посев почвы и пещерного грунта производился на агаризованную овсяную среду ISP3 [10, 43, 133] с добавлением нистатина (150 мкг/мл) и налидиксовой кислоты (50 мкг/мл) для подавления роста микромицетов и грамотрицательных бактерий соответственно. Навеску почвы массой 1 г, освобожденную от корней, помещали в колбу со 100 мл стерильной воды и ставили в шейкер INNOVA 44 при перемешивании 200 об/мин в течение 10 минут. Затем делали серию шестикратных разведений в пробирках, из каждого разведения производили высев по 100 мкл суспензии в двух повторностях.

Пробоотбор производился согласно методике описанной ранее [10, 43, 134]: образец из A1 гумусового слоя почвы (10-15 см) был снят стерильным шпателем и помещен в стерильную емкость для сбора образцов. Актинобактерии выделяли путем поверхностного посева на агаризованные питательные среды из 10-кратных разведений почвенных суспензий [10, 43, 134]. В качестве питательной среды использовали овсяный агар (ISP3) с добавлением нистатина и налидиксовой кислоты для подавления развития микромицетов и грамотрицательных бактерий в конечной концентрации 250 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно, а также в качестве дополнительного селективирующего агента использовали рубомицин (5 мкг/мл) и рифампицин (2 мкг/мл) для изоляции «редких» представителей микробного сообщества [10, 43, 136, 137]. Посев инкубировали 14 суток при температуре 28°C [10].

Засеянные чашки инкубировали в термостате при 28°C. Спустя 14 суток чашки осматривали визуально, оценивали выросшие колонии на предмет принадлежности к мицелиальным представителям Actinomycetota и выделяли представителей отдельных морфотипов в чистые культуры на овсяный агар, культивируя 6 суток при температуре 28°C [43].

Все активные штаммы были сохранены и добавлены в коллекцию с помощью приготовления глицеринового стока. Подготавливают колбы на 25 или 50 мл, в них добавляют по 5-10 мкл жидкой овсяной среды и ставят на шейкер 200 об/мин на 6 суток при комнатной температуре. Подготавливают пробирки в двух повторностях на 2 мл и добавляют по 500 мкл 50% стерильного глицерина (1:1), затем 500 мкл клеточной суспензии. Пробирки хранят при температуре -20°C и -80°C [10].

2.2.2. Полифазно-таксономическая идентификация штаммов

Культуральные признаки актиномицетов, способных синтезировать антибиотики (наличие и окраску воздушного мицелия, выделение растворимых пигментов), оценивали на плотных средах, рекомендованных International Streptomyces Project (ISP), после 14 суток культивирования при 28°C [138, 139].

Морфологические признаки (наличие и форму цепочек репродуктивных спор, характер поверхности спор) оценивали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL Ltd., Акишима, Токио, Япония) спустя 4 дней роста при 28°C на среде Органический агар 79.

Утилизацию источников углерода (моно- и олигосахаридов, спиртов) оценивали с помощью бумажных дисков (HiMediaLab, Индия), разложенных на минеральном агаре ISP 9 с добавлением 0,04% бромкрезолового пурпурного в качестве pH-индикатора при 28°C в течение 14 дней [138]. В том случае, если происходит утилизация конкретного углевода, образуется соответствующая органическая кислота и среда изменяет окраску с фиолетового на светло-желтый цвет ввиду понижения pH среды.

Способность разлагать крахмал, целлюлозу и казеин оценивали согласно ранее описанной методике по размеру зон гидролиза полимеров [135, 139].

Чувствительность к различным антибиотикам определяли с помощью бумажных дисков с заданной концентрацией активного вещества (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Индия). Моноспоровую суспензию актинобактерий распределяли шпателем по агаризованной среде ISP3, подсушивали, раскладывали диски с антибиотиками и инкубировали в течение 7 суток при 28°C [139].

2.2.3. Скрининг антагонистической активности штаммов актиномицетов

Детекцию антибактериальной активности осуществляли на штаммах *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, характеризующийся делецией гена *AtolC*, и *E. coli* BW25113 *lptD*, имеющий делецию в гене *lptD* с 330 по 352. Такая точечная мутация приводит к нарушению синтеза липополисахаридной оболочки грамотрицательных бактерий, тем самым повышает проницаемость для низкомолекулярных соединений [140, 141].

Наличие точечных мутаций в геноме тест-микроорганизмов обуславливает ослабление механизмов защиты и увеличивает чувствительность к антибактериальным веществам, что в

свою очередь повышает вероятность обнаружения нового метаболита. Помимо этого, данные штаммы содержат в своем составе плазмиду pDualrep2 [140], несущую гены флуоресцентных белков TurboRFP или Katushka2S, на экспрессию которых могут влиять вещества, вызывающие в сублетальных концентрациях ингибирование репликации ДНК или трансляции, соответственно.

Для проведения скрининга на репортёрных штаммах использовали метод диффузии в агаре описанный в методике [141]. Штаммы выращивали на ISP3, тестирование проводили на 6, 9 и 12 сутки, для этого из участка газона с отчетливым ростом вырезали агаровый блок диаметром 5 мм и помещали его на чашки, содержащие агаризованную LB среду, предварительно засеянные культурами тест-организмов. Флуоресцентный сигнал детектировали на следующий день с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad) в предустановленных каналах каналов Cy-3 и Cy-5.

2.2.4. Глубинное культивирование активных штаммов

Активные изоляты наращивали в колбах объемом 250 мл, заполненных 50 мл жидкой среды, на которой была выявлена наибольшая активность в ходе скрининга, при интенсивном перемешивании (200 об/мин, 28°C) в термошейкере INNOVA 44 в течение 6 суток. 3, 6, 9, 12, 15 и 20 сутки и тестировали на чувствительных к нему тест-организмов. В случае, если регистрировался достаточный уровень активности, то культивирование прерывали и ферментационная жидкость подвергалась очистке от биомассы путем центрифугирования в Centrifuge 5910 R (Eppendorf) при 4500 об/мин в течении 10 минут, и последующей хроматографической очистке [10].

2.2.5. Получение компетентных клеток *Esheria coli* с использованием хлорида кальция

Компетентные клетки получали согласно методике, описанной с применением хлористого кальция и ДМСО. Культуру клеток выращивали при интенсивном перемешивании в 50 мл LB при 30°C до оптической плотности $OP_{600} = 0,4-0,6$ ОЕ. Клетки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Полученный осадок суспендировали в 15 мл буфера (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 50 mM CaCl₂) и снова осаждали клетки. К осадку клеток добавляли 2 мл охлажденного буфера (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 50 mM CaCl₂), а затем 225 мкл ДМСО. Отбирали аликвоты по

100 мкл и замораживали в жидком азоте. Компетентные клетки хранились при -70°C 1-2 месяца без значительного снижения эффективности трансформации [142].

2.2.6. Трансформация клеток *Escherichia coli* с помощью метода теплового шока

200 мкл компетентных клеток смешивали с 10-20 нг плазмидной ДНК и оставляли на льду в течение 30 мин. Температурный шок, способствующий увеличению эффективности трансформации, проводили при 42°C в течение одной минуты. После охлаждения во льду в течение 5 минут, клетки ресуспендировали в 0,8 мл среды LB, состав среды представлен в подразделе 2.1.1., и растили в течение часа при 37°C. После этого клеточную суспензию наносили на чашки с твердой средой LB и антибиотиком для селекции и инкубировали при 37°C до появления колоний [14].

2.2.7. Подготовка электрокомпетентных клеток и условия электропорации

Клетки *E. coli* для проведения электропорации готовили по методики [142]. Культуру клеток выращивали в 50 мл LB, состав среды представлен в подразделе 2.1.1., из расчета 1/100 объема свежей ночной культуры *E. coli*, и растили при 37 градусах при 200 об/мин до ОП600 = 0,5-0,7 ОЕ. Выращенные клетки остужались на льду в течение 20 мин и по достижению времени инкубации осаждались путем центрифугирования в течение 15 минут при 4 градусах на 4000 об/мин. Полученный осадок клеток суспендировался в равном объеме 10% глицерина с последующим осаждением. Осадок суспендировался в ½ объема 10% глицерина и повторяли процедуру центрифугирования при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Осадок суспендировался в 1/25 объема 10% глицерина с последующим осаждением при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Финальный осадок растворялся в 1/250 объема 10% глицерина.

Для электропорации отбиралась аликвота электрокомпетентных клеток в объеме 40 мкл и 1-2 мкл плазмиды/реакции Гибсона. Полученная смесь инкубировать в течение 1 минуты на льду и по истечению времени инкубации смесь помещалась в заранее охлажденную кювету с размером щели 0,1/0,2 см. Электропорацию проводили в MicroPulser electroporator и использовали программу Ec1/Ec2.

По окончании процедуры добавляли немедленно 1 мл SOC среды в кювету, аккуратно и быстро суспендировали клетки. Этот этап очень важен, поскольку по истечению минуты эффективность трансформации падает.

Трансформированные клетки инкубировались при 37°C в течение 1 часа при 225 об/мин и высевались на агаризованную среду с селективным маркером.

2.2.8. Подготовка моноспоровой суспензии штаммов актиномицетов

Для моноспоровой суспензии использовались клетки возрастом 5-7 суток, выращенные на агаризованной среде ISP3 в косяках. Далее участок агара, расположенный у вершины косяка, вырезался размером 1x1 см² и подвергался гомогенизации с помощью стеклянных шариков в фосфатном буфере. Полученная суспензия декантировалась через стерильный марлевый фильтр.

2.2.9. Подготовка электрокомпетентных клеток актиномицетов и условия электропорации

Подготовка клеток осуществлялась согласно методике [144], с модификациями. Клетки актиномицетов выращивали в среде MG-1, состав среды представлен в подразделе 2.1.1., в течение 5-7 суток при 30 градусах с постоянным перемешиванием 250 об/мин. Время инкубации зависит от штамма актиномицетов и его скорости достижения экспоненциальной фазы роста. По истечению времени, клетки помещаются в лед и осаждаются с помощью центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 минут при 4 градусах. Полученный осадок суспендировался в равном объеме 10% 0,3М сахарозе/сорбитоле и повторялась процедура осаждения. Осадок клеток суспендируют в 5 мл Р-буфер (0,3 М сахароза; 10 мМ K₂SO₄; 0,2% раствор микроэлементов (0,04 мг/л ZnCl₂; 0,2 мг/л FeCl₃*6H₂O; 0,01 мг/л CuCl₂*2H₂O; 0,01 мг/л MnCl₂*4H₂O; 0,01 мг/л Na₂B₄O₇ *10H₂O; 0,01 мг/л (NH₄)₆Mo₂₄*4H₂O); 0,36 мМ KH₂P0₄; 10 мМ MgCl₂; 2,5 мМ CaCl₂) с добавлением ТЕ буфера pH 8,0 (0,25 М Трис-HCl pH 8,0; 25мМ ЭДТА pH 8,0) и обрабатывают 1 - 3 мг/мл лизоцима (HEWL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Обработанные лизоцимом клетки инкубировали при 37°C в течение 60 минут с бережным перемешиванием 100-120 об/мин. Используется минимальная концентрация лизоцима, поскольку задачей является уменьшить толщину пептидогликанового слоя, для повышения эффективности электропорации. Далее 1 мл суспензии клеток промывали 5 раз 15% раствором глицерина. Финальный осадок растворяли в 200 мкл 15% глицерина. На электропорацию

использовали 50 мкл клеток и 0,5 мг/мл – 2 мг/мл плазмидного вектора pAcTransTest. Режим электропорации 2,5-4 кВ/см в течение 2,5-4 мсек.

После электропорации клетки переносили в 1 мл питательной среды MG-1 и инкубировали при 28°C с постоянным перемешиванием 250 об/мин в течение 16-24 часа. Далее клетки распределяли на агаризованную среду Органический агар 79, состав которой представлен в подразделе 2.1.1., с селективным маркером – апрамицин в концентрации 50 мкг/мл и выращивали при 28°C в течение 1-2 недель до появления первых колоний [13, 144].

2.2.10. Подготовка клеток актиномицетов и штамма *Escherichia coli* для конъюгативного переноса плазмидной ДНК

Для проведения конъюгации поэтапно были подготовлены клетки донора – *E. coli* ET12567/pUZ8002 и клетки актиномицетов. Плазмидами pCRISPomyces-2, pAcTransTest трансформировали штамм *E. coli* ET12567/pUZ8002. Полученные на чашках колонии засеивали в жидкую среду LB с концентрацией апрамицина 50 мкг/мл, канамицина 25 мкг/мл и хлорамфеникола 25 мкг/мл и растили при 37°C, интенсивно помешивая, до ОП₆₀₀ = 0,4 ОЕ. Выращенные клетки осаждались посредством центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 минут при 4°C. Полученный осадок клеток суспендировался в 10 мл LB с последующим осаждением в тех же условиях. Далее финальный осадок растворялся в 1 мл LB [43, 145].

Для конъюгации использовались споры актиномицетов и соответствовали этапам подготовки, указанным в подразделе 2.2.8. Для конъюгации 10 мкл спор стрептомицетов 10⁸ добавляли к 500 мкл 2хYT среды, компоненты описаны в подразделе 2.1.1. и инкубировались при 50°C в течении 10 минут, по истечению времени остужали на комнатной температуре в течение 15 минут.

Далее 500 мкл клеток *E. coli* ET12567/pUZ8002 и 500 мкл спор тщательно перемешивали посредством центрифугирования. Большую часть надосадочной жидкости удаляли, оставляя 50 мкл для суспендирования осадка смеси клеток. Готовилась серия разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁴ в деионизованной стерильной воде. 100 мкл каждой серии разведения распределяли на агаризованной MS среде, состав которой прописан в подразделе 2.1.1., с добавлением 10мМ хлорида магния без антибиотика и инкубировали при 30 градусах в течение 16-20 часов.

По истечению времени инкубации чашки покрывали 1 мл водным раствором смеси антибиотиков в количестве 0,5 мг налидиксовой кислоты и 1,125 мг апрамицина. Продолжали инкубацию в тех же условиях до появления первых колоний.

2.3. Методы генной инженерии

2.3.1. Полимеразная цепная реакция

Амплификацию генов для получения целевых конструкций проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в объеме 30 мкл [146]. Фрагменты ДНК амплифицировали с помощью 2х *KAPA HiFi HotStart Ready mix* набора (KAPA biosystem, США). При использовании ДНК-полимеразы следовали рекомендациям фирмы-производителя фермента, представленных в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Условия для проведения ПЦР

Компонент	Количество
KAPA HiFi HotStart Ready mix	1×кратный
прямой и обратный праймеры	0,3 мкМ
плазмидная (хромосомная) ДНК	20 (100) нг
смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов	0,2 мМ каждого
деионизированная вода	до 30 мкл

Амплификацию проводили в течение 30-35 циклов. Денатурацию ДНК проводили при 98°C в течение 20 сек, отжиг праймеров – при 60-70°C в течение 15 сек, синтез ДНК – при 72°C в течение 45 секунд – 10 минут в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента [142, 145 - 147]. Температуру отжига олигонуклеотидов приблизительно оценивали по формуле

$$2(A+T)+4(G+C) = T(^{\circ}\text{C}), \quad (2.1)$$

где А, Т, G, С – количество нуклеотидных остатков в последовательности праймера;

T(°C) – температура отжига.

Праймеры для создания генетической конструкции pAcTransTest представлены в Таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Праймеры для генетической конструкции pAcTransTest

Название плазмиды	Последовательность 5' - 3'
FOR_rpsL	gcacagatgaGTCTTCTCAGCCGCTACAG
REV_rpsL	atcctctcatTACGTCTCCGTCGTCTAC
FOR_gapdh	gcacagctgaTGAGAATTCAGATCTACGCGTTC
REV_gapdh	ccatacaaaaTCCTCCAGCGTATCCCCCTTTC
FOR_Katushka2S	cggagacgtaATGAGAGGATCGGGATCCTTAC
REV_Katushka2S	tgaattctcaTCAGCTGTGCCCCAGTTTG
FOR_RFP	cgtgtggaggaTTTTGTATGGGCGAGCTG
REV_RFP	cctgtagcggctgagaagacTCATCTGTGCCCCAGTTTG
F_chk1	ttgtgagggtgcgcgcc

Продолжение Таблицы 2.5

Название плазмиды	Последовательность 5' - 3'
R_chk1	gtgcacttgaagtgggtgctgtcac
F_chk2	gtggaccggagactggaaagaatc
R_chk2	caatgacaacaaccatcgccac
F_chk3	caatgacaacaaccatcgccac
R_chk3	gtgcacttgaagtgggtgtgttcac
F_chk4	gtggaccacagactggaaagaatc
R_chk4	tcggaacaggagagcgcac

2.3.2. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для анализа фрагментов ДНК использовали электрофорез в агарозном геле [146]. Электрофорез проводили в горизонтальных пластинах геля агарозы в аппарате Mini-Sub® Cell GT при напряжении электрического тока 90 В. Концентрация агарозы составляла 1%. Агарозу растворяли в 1X Трис-ацетатном буфере, содержащем 40 мМ трис-ацетата pH 7,8 и 2 мМ ЭДТА. Непосредственно перед полимеризацией в агарозу добавляли бромистый этидий до концентрации 1,5 мкг/мл. К образцам перед нанесением на гель добавляли 1/5 объема раствора, содержащего 0,1% БФС и 30% глицерин. В качестве электродного буфера использовали 1x Трис-ацетатный буфер (40мМ Трис-ацетат, pH 7,8 и 2мМ ЭДТА). После электрофореза ДНК в геле анализировали в зоне ближнего ультрафиолетовом свете (356 нм) [142, 145].

2.3.3. Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК

Для очистки фрагменты ДНК разделяли при помощи электрофореза в геле 1% или 2% легкоплавкой агарозы. После окрашивания бромистым этидием гель анализировали в ближнем ультрафиолете (356 нм). Зоны геля, содержащие целевые фрагменты, вырезали. Экстракцию образца из геля проводили с использованием фирменных наборов QIAquick® Gel Extraction Kit в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Наработку и очистку плазмидных векторов осуществляли из 5 мл культуры клеток *E. coli*, содержащих целевую конструкцию с помощью коммерческого набора LumiSpin PLASMID в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Фрагменты ДНК и плазмидную ДНК элюировали из спин-колонок с помощью деинозованной воды для проведения дальнейших исследований [142].

2.3.4. Выделение и очистка тотальной РНК из грамположительных бактерий

Выделение геномной ДНК осуществлялось по методу Вильсона [147] с модификациями. 2-3 колонии клеток посеять в жидкую питательную среду (не на основе овсяной крупы и не Гаузе 1) объемом 5 мл и проводить культивирование в течение 2-4 дней, все зависит от скорости роста клеток. Полученную культуральную массу осадить центрифугированием в течение 10 минут – 4500 об/мин. Удалить супернатант, осадок суспендировать в 600 мкл ТЕ буфера pH 8,0 (0,01М Трис-HCl, 0,001М ЭДТА) с добавлением 5 мг/мл лизоцима и инкубировать смесь в течение 1 часа при температуре 37°C и постоянном перемешивании при 500 об/мин на настольном термостате. В реакционную смесь добавить 5 мкл 20 мкг/мл протеиназы К и 60 мкл 20% ДСН (усиливает активность фермента) и инкубировать в течение 2-3 часов при постоянном перемешивании при 37°C (температурный диапазон протеиназы К 20-60 градусов).

К смеси добавить 750 мкл Lumizol – инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут. По истечению времени внести 150 мкл хлористого метилена/хлороформа (из расчета 200 мкл на каждый 1 мл Lumizol) и перемешать суспензию, путем переворачивания пробирки и осадить смесь в течение 10 минут на 14000 об/мин при 4°C. Отобрать верхнюю водную фракцию в чистый эппендорф и внести 1 мл хлористого метилена/хлороформа и повторить осаждение в течение 10 минут на 14,000 об/мин при 4°C. Далее отобрать верхнюю водную фракцию в чистый эппендорф и внести 1 мл хлористого метилена/хлороформа и повторить осаждение в течение 10 минут на 14000 об/мин при 4°C. Переместить водную фракцию в новый эппендорф и добавить 1/10 объема 7,5М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (если объем водной фракции составляет 500-600 мкл, значит 50 - 60 мкл ацетата аммония – используется для осаждения любой РНК в отличие от ацетата натрия) и внести 1,5-2 объема 96% этанола и инкубировать при -20°C от 30 минут до нескольких суток.

Осадить смесь в течение 30 минут на 14000 об/мин при 4°C. Полученный осадок промыть 1 мл 80% этанола путем в течение 30 минут на 14000 об/мин при 4°C, повторить процедуру. Полученный осадок высушить на комнатной температуре либо при 37°C. Растворить осадок в 50 мкл воды без РНКаз. К полученному водному раствору, объемом 50 мкл, добавить 10 мкл 10x DNase buffer (фирменный), 3 мкл 2000 ед/акт ДНКазы 1 и довести все до 100 мкл водой. Реакцию проводить на 37°C и инкубировать смесь в течение 3 часов без перемешивания (не инактивируем нагреванием, тк при 75 градусах РНК может денатурировать). К полученной смеси добавить 100 мкл Lumizol - инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут. Далее добавить 20 мкл хлористого метилена/хлороформа (из расчета 200 мкл на каждый 1 мл Lumizol) – перемешать суспензию, путем переворачивания пробирки и осаждавать в течение 10 минут на

14000 об/мин при 4°C. Отобрать верхнюю водную фракцию в чистый эппендорф и внести 200 мл хлористого метилена/хлороформа и повторить осаждение в течение 10 минут на 14000 об/мин при 4°C. Далее отобрать верхнюю водную фракцию в чистый эппендорф и внести 200 мл хлористого метилена/хлороформа и повторить осаждение в течение 10 минут на 14000 об/мин при 4°C. Переместить водную фракцию в новый эппендорф и добавить 1/10 объема 7,5М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (если объем водной фракции составляет 500-600 мкл, значит 50-60 мкл ацетата аммония – используется для осаждения любой РНК в отличие от ацетата натрия) и внести 1,5-2 объема 96% этанола и инкубировать при -20°C от 30 минут до нескольких суток.

Осадить смесь в течение 30 минут на 14000 об/мин при 4°C. Полученный осадок промыть 1 мл 80% этанола в течение 30 минут на 14000 об/мин при 4°C, повторить процедуру. Полученный осадок высушить на комнатной температуре либо при 37°C. Растворить осадок в 30 мкл воды без РНКаз.

2.3.5. Выделение и очистка геномной ДНК из грамположительных бактерий

Выделение геномной ДНК осуществлялось по методу [148] с модификациями. К колониям клеток, возрастом 5-7 суток, добавить 600 мкл ТЕ буфера рН 8,0 (0,01М Трис-НСl, 0,001М ЭДТА) с добавлением 5-10 мг/мл лизоцима и инкубировать 1,5 часа при 37°C с постоянным помешиванием. Далее к реакционной смеси добавить 15 мкл 20% ДСН инкубировать 1 час при 37 градусах. По истечению времени инкубации добавить 10 мкл 10 мг/мл РНКазы А инкубировать в тех же условиях. После этого внести 10 мкл 20 мг/мл Proteinase К выдерживать реакцию на 55 градусах в течение 2х часов.

Далее поэтапно добавлять 50 мкл 20% ДСН, а по истечению 15 мин, внести в реакцию 100 мкл 5М NaCl и выдерживать при 65°C 30 мин. Далее происходит фенол/хлороформная экстракция с помощью фенола, насыщенного Трис-НСl рН 8,0. Финальный объем высадить 0,3 объема изопропанола и инкубировать при 4°C от 15 минут и выше. Далее осадить ДНК путем центрифугирования и дважды промыть 70% раствором этанола. Высушить осадок и растворить в деионизованной воде [149].

2.3.6. Сборка ДНК по Гибсону

Для получения целевых генетических конструкция использовался коммерческий набор NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix. Реакция проводилась в 20 мкл при 50°C в течение 15-60 минут. При использовании набора следовали рекомендациям фирмы-производителя фермента, представленных в Таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Условия для проведения реакции Гибсона

Компонент	Количество
HiFi DNA Assembly Master Mix	1×кратный
Плазмидный вектор	50 нг
Вставки	100-200 нг
Деионизированная вода	до 20 мкл

2.3.7. Обработка ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции

Рестрикцию ПЦР смесей для удаления исходных плазмидных векторов pCRISPOmyces-2 и pDualrep2 проводили с помощью сайт-специфической эндонуклеазой рестрикции DpnI (New England Biolabs, США) в ПЦР смеси и с добавлением фирменного буфера rCutSmart. Обработку плазмидной ДНК проводили в 50 мкл при 37°C в течение 1 часа. Фермент инактивировали прогревом 20 минут при 80°C.

2.3.8. Обратная транскрипция

Анализ транскрипционной активности генов осуществляли посредством ПЦР с обратной транскрипции. Для этого использовали РНК, выделенную согласно подразделу 2.3.4. кДНК получали, используя M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs) набор реагентов, согласно протоколу фирмы производителя. На первом этапе смешать образец РНК с праймером и дезоксинуклеотидтрифосфатами в количестве представленном в Таблице 2.7.

Таблица 2.7 – Условия проведения обратной транскрипции – смесь 1

Компонент	Количество
РНК	1 нг – 1 мкг
60 мкМ олигонуклеотидный праймер	12 мкМ
10 мМ dNTPs	1 мкМ
Деионизированная вода	до 10 мкл

Полученную смесь в течение 1 минуты при 65 градусах для плавления вторичных структур РНК. Далее внести другие компоненты отраженные в Таблице 2.8.

Таблица 2.8 – Условия проведения обратной транскрипции – смесь 2

Компонент	Количество
10х реакционный буфер	1х
10 ед/мкл М-MuLV RT	0,1 – 1 ед/мкл
40 ед/мкл ингибитор РНКаз	0,4 ед/мкл
Компонент	Количество
+смесь 1	10 мкл
Деионизированная вода	до 20 мкл

Готовую смесь инкубировать при 42 градусах в течение 1 часа. По окончании времени инкубации, инактивировать реакционную смесь при 80°C в течение 5 минут.

Полученная смесь кДНК, была использована для проведения классической ПЦР согласно подразделу 2.3.1., на реакцию использовалась 1/10 объема смеси кДНК [150].

2.4. Биохимические методы

2.4.1. Выделение и идентификация активного вещества

Для наибольшей продукции целевого метаболита использовали жидкую среду ISP3, на которой культивировали штаммы актиномицетов в течении 7 суток при 28°C в условиях непрерывного перемешивания на орбитальном шейкере New Brunswick Innova (Eppendorf) при 200 об/мин. Далее с помощью центрифугирования при 4,000 g отделяли культуральную жидкость (КЖ) от биомассы. Полученную КЖ очищали с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ), используя хроматографическую колонку Poly-Prep Econo-Pac (Bio-Rad), содержащую 1 мл сорбента LPS-500H (Техносорбент, Россия) [139].

После этого, производили элюцию в ступенчатом градиенте вода-ацетонитрил с фракционным сбором элюата.

Антагонистическая активность собранных фракций была исследована и активная фракция была использована для дальнейшей ВЭЖХ очистки. ВЭЖХ-анализ и фракционирование выполняли с помощью системы Vanquish Flex с использованием детектора с диодной матрицей (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), оснащенного колонкой Luna 5 мкм C18(2) 100 Å, 250 × 4,6 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) скорость потока 1 мл/мин, инъекционный объем - 20 мкл. Для разделения образца использовали воду в качестве элюента А и ацетонитрил в качестве элюента В. Активные фракции анализировали с использованием хромато-массспектрометрической системы на базе хроматографа UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), оснащенных колонкой Acclaim RSLC 120 C18 2,2 мкм 2,1 × 100 мм (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и qToF массспектрометра maXis II 4G ETD (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) и режим регистрации спектра: режим ионизации электроспрей, полное сканирование от 100–1500 м/з, МС/МС с выделением трех наиболее интенсивных ионов, тип диссоциации: CID 10–40 эВ, ионизация молекул исследуемого вещества осуществляется в потоке инертного азота. Масс-спектры обрабатывали с помощью OpenChrom Lablicate Edition (1.4.0.202201211106), TOPPView v.2.6.0 [150]. Химические структуры были идентифицированы с использованием баз данных GNPS [150], NPAtlas [151, 152], и Dictionary of Natural Products 31.1 [153]. Активную ВЭЖХ-фракцию в количестве 1 мл концентрировали с помощью вакуумного биоконцентратора CentriVap Vacuum Concentration System (Labconco), растворяли в 50 мкл ДМСО и добавляли 450 мкл воды и именовали «рабочий раствор антибиотика» [139].

2.4.2. Спектрофотометрическое определение концентрации нуклеиновых кислот

Определение концентрации нуклеиновых кислот проводили по поглощению в ультрафиолетовой области спектра (200-300 нм), используя спектрофотометр «NanoDrop». В кювете с длиной оптического пути $l=1$ см измеряли поглощение A разбавленного раствора анализируемого вещества.

2.5. Методы биоинформатики

2.5.1. Секвенирование и анализ геномов представителей филума Actinomycetota

Геномная ДНК актинобактерий выделялась согласно подразделу 2.3.5. Секвенирование геномов штаммов производилось *de novo* с использованием платформы Illumina HiSeq 4000 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Сборка геномов была осуществлена с помощью SPAdes v3.13.0 [154]. Геномы аннотировались с использованием алгоритма PROKKA версии 1.14.5 [139,155], БГК антибиотиков осуществлялось с применением antiSMASH 7.0 [139, 156].

2.5.2. Филогенетический анализ представителей филума Actinomycetota на основе полногеномного секвенирования

Филогенетическую принадлежность исследовали по полногеномной последовательности с использованием сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS) [157].

Геномы штаммов автоматически сопоставлялся со всеми геномами, представленными в базе данных TYGS, с помощью алгоритма MASH [157, 158]. Филогенетические деревья были получены с помощью FastME 2.1.6.1 на основании расстояний GBDP, рассчитанных исходя из нуклеотидных последовательностей генома. Длины ветвей были масштабированы по формуле расстояния GBDP d5 [159, 160].

Данные 16S рРНК штаммов использовали для сравнительного анализа с аналогичными последовательностями, размещенными в базе данных ГенБанк с применением алгоритма BLAST.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Исследование регуляции биосинтеза Альбомицина $\delta 2$ и Дефероксамина Е в штамме *Streptomyces globisporus* bja209

Штамм *Streptomyces globisporus* bja209 был выделен из 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 $\delta 2$ – известный ингибитор биосинтеза белка, проникающий в клетки по механизму «Троянского коня» и Дефероксамин Е, для которого впервые была показана способность индуцировать СОС-ответ в пределах бактериальной клетки.

3.1.1. Генетический и филогенетический анализ представителя *Streptomyces globisporus* bja209

Геном штамма bja209 представлен хромосомой размером 7,865,380 п.о. и линейной плазмидой 165,749 п.о., что в сумме составляет 8,031,129 п.о. с содержанием G+C 71,42%, а это соответствует содержанию G+C для родов, относимых к филуму *Actinomycetota* [161, 162]. На хромосоме представлено 18 рибосомальных оперонов, 83 тРНК, 1 тмРНК и 7114 кодирующих последовательностей. Филогенетическое древо штамма bja209 и его филогенетически близкие штаммы отражены на Рисунке 3.1.

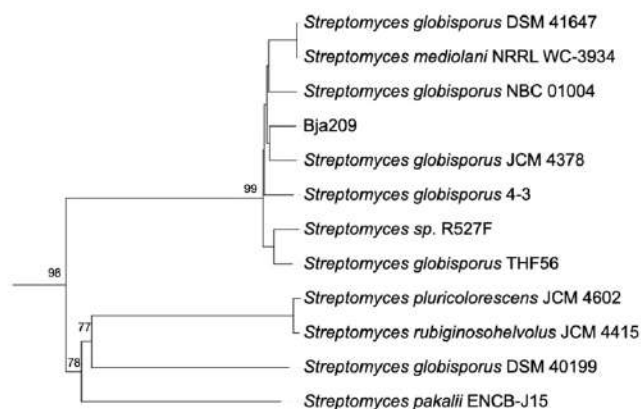


Рисунок 3.1 – Филогенетическое положение штамма bja209 относительно наиболее близкородственных штаммов, а также типовых штаммов рода *Streptomyces* определенное на

основании полногеномных последовательностей. Длина ветвей определена в терминах расстояния GDP по формуле d5. Указаны значения псевдозагрузки >60% для 100 повторов

Филогенетический анализ как на основе 16S рРНК, так и полногеномной последовательности, в сопоставлении с последовательностями типовых штаммов видов, размещенных в базе данных TYGS и ГенБанк, показал, что штамм bja209 принадлежит к виду *Streptomyces globisporus*, что позволяет именовать его в дальнейшем *S. globisporus* bja209.

Сравнение значений OrthoANIu между bja209 и полных геномов типовых штаммов *S. globisporus* NBC_01004 и *S. globisporus* THF56 составило 99,49% и 99,48% соответственно, что превышает порог 95%, являющийся критерием принадлежности штаммов к одному виду [163]. Сравнительная характеристика штамма bja209 представлена в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Сравнительный геномный анализ штамма *S. globisporus* bja209 и филогенетически-близких штаммов

	1	2	3	4	5	6
Размер генома, т.п.о.	8,074,519	7,957,062	7,666,521	7,783,599	7,783,599	7,914,357
G+C, %	71.42	71.43	71.54	71.54	71.54	71.54
Количество генов	7186	7074	6837	6921	6921	7040
Контиги	2	2	3	3	3	62
рРНК	18	18	18	18	18	3
тРНК	83	84	84	79	79	83
ANI с bja209, %	--	99.49	99.48	96.01	96.01	99.40
dDDH, %	--	96.00	95.90	82.00	82.00	92.50
Различие G+C, %	–	0.02	0.09	0.10	0.10	0.13

Штаммы (GenBank accession): 1. bja209; 2. *S. globisporus* NBC_01004 (GCF_045162705.1); 3. *S. globisporus* THF56 (CP029361.1); 4. *S. globisporus* DSM 40199 (GCA_014649555.1); 5. *S. globisporus* C-1027 (GCF_000261345.2); 6. *S. globisporus* 4-3 (GCA_935184445.1); «--» - нет информации по представленной сравнительной характеристике.

S. globisporus NBC_01004 и *S. globisporus* THF56, аналогично *S. globisporus* bja209, являются носителями крупных линейных плазмид [164, 165]. Линейные плазмиды располагаются преимущественно в терминальных участках линейной хромосомы, имеют собственные ориджины репликации, а также последовательности генов участников репликации, в особенности ДНК-связывающие белки [166, 167]. Плазмида может существовать отдельно и автономно реплицироваться, участвуя в конъюгативном переносе генов, а также находиться в ассоциированном с хромосомой состоянии [168].

Анотирование генов биосинтеза вторичных метаболитов с помощью antiSMASH 8.0.1 [169] выявило 33 потенциальных БГК, четыре из которых с высокой вероятностью (псевдозагрузка 85 - 95% по шкале поддержки) могут кодировать соединения с показанной антимикробной активностью, к ним относятся: Альбомицин δ 2, Дефероксамин Е, Гризеобактин

и антибиотик C-1027. Остальные БГК потенциально кодируют пигменты, осмопротекторы, либо кластеры представленные 30-60% достоверно необходимыми для кодирования генами. Хромосомная топология штамма bja209 представлена на Рисунке 3.2. Предсказанные таким образом антимикробные соединения выступали первичными кандидатами для идентификации продуцируемых штаммом соединений.

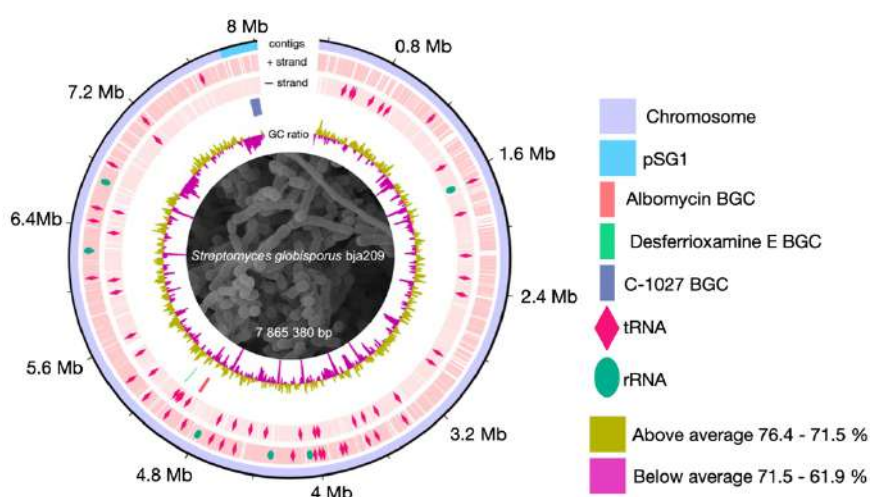


Рисунок 3.2 – Схема хромосомы *S. globisporus* bja209. Внешнее кольцо: геномные координаты (хромосома и линейная плазмида pSG1). Средние кольца: расположение и идентификация генов тРНК (розовый ромб) и рРНК (зеленый овал), а также ключевых биосинтетических генных кластеров (БГК), обсуждаемых в данном исследовании (Альбомицин δ 2, Дефеоксамин E, C-1027). Внутреннее кольцо – соотношение G+C

3.3.2. Морфофизиологические свойства штамма *Streptomyces globisporus* bja209 и закономерности регуляции первичного метаболизма

Как и остальные представители вида *S. globisporus* штамм *S. globisporus* bja209 развивается в аэробных условиях, положительно окрашивается по методу Грама и не образует подвижных клеток. Обильно растет на питательных средах IPS3 и ISP6 и умеренно на среде IPS5. На используемых питательных средах окраска субстратного мицелия варьируется от белой до бежевой, воздушный мицелий бежевый [139]. При культивировании на овсяном агаре bja209 выделяет ярко-охристый растворимый пигмент, на среде с цитратом железа (ISP6) меланоидных пигментов не образует.

При росте на вышеуказанных плотных средах штамм *S. globisporus* bja209 образует субстратный мицелий, на котором на 2-3 сутки образуется хорошо развитый воздушный мицелий

с прямыми гифами. Штамм bja209 формирует прямые гладкие споры, что характерно для представителей *S. globisporus* и показано на Рисунке 3.3.

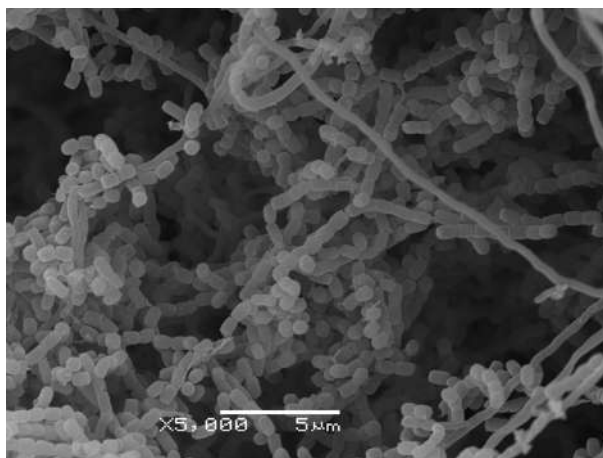


Рисунок 3.3 – Цепочки спор штамма *S. globisporus* bja209 на воздушном мицелии на 14 сутки инкубации на среде ISP3 при 28 °C, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа

Предметом изучения в настоящей работе было прежде всего исследование продуктов и закономерностей вторичного метаболизма, который является усложненной версией первичного метаболизма и подчиняется сходным закономерностям. Наиболее простым и наглядным для изучения аспектом первичного метаболизма является утилизация углеводов и сравнение этих свойств с близкородственными штаммами. Были проведены исследования способности штамма *S. globisporus* bja209 утилизировать различные углеводы с помощью диско-диффузионного метода. Данные отражены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Спектр утилизация углеводов штаммами на среде ISP9: 1) *S. globisporus* bja209; 2) *S. globisporus* subsp. *globisporus* DSM 40199 и 3) *S. globisporus* 4 - 3

Источник углерода	1	2	3
D-глюкоза (De)	+	+	+
Фруктоза (Fc)	+	+	+
Манноза (Mo)	+	н.о.	+
Ксилоза (Xy)	+	н.о.	+
Целлобиоза (Ce)	+	+	н.о.
Трегалоза (Te)	+	н.о.	н.о.
Рамноза (Rh)	+	+	+
Источник углерода	1	2	3
Лактоза (La)	+	н.о.	–
Мальтоза (Ma)	+	н.о.	+
Маннит (Mn)	+	+	+
Арабиноза (Ar)	–	+	+
Галактоза (Ga)	–	н.о.	+

Продолжение Таблицы 3.2

Источник углерода	1	2	3
Инозит (Is)	—	н.о.	—
Сахароза (Su)	—	н.о.	—
Инулин (In)	—	н.о.	—
Мелибиоза (Mb)	—	н.о.	—
Сорбит (Sb)	—	н.о.	—
Салицин (Sa)	—	н.о.	н.о.
Адонит (Ad)	—	н.о.	—
Дульцит (Du)	—	н.о.	—
Раффиноза (Rf)	—	—	—

«--» - не наблюдается утилизации источника углевода; «н.о.» - не обнаружено данных.

В том случае, если происходит утилизация конкретного углевода, образуется соответствующая органическая кислота и среда изменяет окраску с фиолетового на светло-желтый цвет ввиду понижения pH среды.

Для сравнения мы использовали ранее выделенный и описанный в нашей лаборатории штамм *S. globisporus* 4 - 3 продуцент Альбомуцина $\delta 2$. Отличительной особенностью штамма *S. globisporus* bja209 от *S. globisporus* 4 - 3, это неспособность последнего метаболизировать лактозу (для типового представителя данного вида соответствующей информации нет). Метаболизм лактозы для представителей актиномицетов является штамм-специфичным свойством и происходит посредством цитоплазматического фермента бета-галактозидазы, который напрямую осуществляет гидролиз бета-гликозидной связи в молекуле лактозы. В геноме представителей вида *S. globisporus* в среднем представлено от 1-4 последовательностей бета-галактозидаз [170], расположенных преимущественно в терминальных участках хромосом. Характерной особенностью терминальных регионов является подверженность к крупным хромосомным перестройкам, в виду наличия генов транспозаз. В геноме обоих штаммов содержится 4 гена β -галактозидазы: *bga*, *lacZ1*, *lacZ2*, *lacZ3*. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков ферментов, показали 100% гомологию трех вариантов. Оказалось, что штамм *S. globisporus* 4-3 обладает усеченным с N-терминального конца вариантом гена *lacZ3*, который участвует во взаимодействии отдельных субчастиц и организации активной тетрамерной структуры фермента. Таким образом мутация в гене *lacZ3* приводит к неспособности метаболизации штаммом лактозы [171]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *lacZ3* среди близкородственных штаммов отражено на Рисунке 3.3.

LacZ3_bja209	MPLTHLDLAGHPRPQLVREADDWHDLGGPWQFAFDDADLGRSERMDPSVAPYTDVVTVPPESKASGIADSGHHPVLW
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	MPLTHLDLAGHPRPQLVREADDWHDLGGPWQFAFDDADLGRSERMDPSVAPYTDVVTVPPESKASGIADSGHHPVLW
LacZ3_41647	MPLTHLDLAGHPRPQLVREADDWHDLGGPWQFAFDDADLGRSERMDPSVAPYTDVVTVPPESKASGIADSGHHPVLW
LacZ3_NCB01004	MPLTHLDLAGHPRPQLVREADDWHDLGGPWQFAFDDADLGRSERMDPSVAPYTDVVTVPPESKASGIADSGHHPVLW
LacZ3_THF56	-----
LacZ3_bja209	YRRTLALSAPADGHRLLLHFAGVDYRAEVWLDGRLVGRHEGGHTGSSCDLTDAVRHGAEQVLVVRAEQDPLDAAQPRGKQ
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	YRRTLALSAPADGHRLLLHFAGVDYRAEVWLDGRLVGRHEGGHTGSSCDLTDAVRHGAEQVLVVRAEQDPLDAAQPRGKQ
LacZ3_41647	YRRTLALSAPADGHRLLLHFAGVDYRAEVWLDGRLVGRHEGGHTGSSCDLTDAVRHGAEQVLVVRAEQDPLDAAQPRGKQ
LacZ3_NCB01004	YRRTLALSAPADGHRLLLHFAGVDYRAEVWLDGRLVGRHEGGHTGSSCDLTDAVRHGAEQVLVVRAEQDPLDAAQPRGKQ
LacZ3_THF56	-----
LacZ3_bja209	DWRSRPHVIWYHRTSGIQPVWLEEVDPQHLLTLHWTDPVAHARVRCALRLNRWPRRTLRTDVRVVLGDRVLAEQRLAE
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	DWRSRPHVIWYHRTSGIQPVWLEEVDPQHLLTLHWTDPVAHARVRCALRLNRWPRRTLRTDVRVVLGDRVLAEQRLAE
LacZ3_41647	DWRSRPHVIWYHRTSGIQPVWLEEVDPQHLLTLHWTDPVAHARVRCALRLNRWPRRTLRTDVRVVLGDRVLAEQRLAE
LacZ3_NCB01004	DWRSRPHVIWYHRTSGIQPVWLEEVDPQHLLTLHWTDPVAHARVRCALRLNRWPRRTLRTDVRVVLGDRVLAEQRLAE
LacZ3_THF56	-----
LacZ3_bja209	DQETVFDIAVPALRHAQDLALLWSPEPRLVDATVVTDAEDGHEIDRVTSYLGRLDIGWEDGGFQLNHKPCFLRLALQ
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	DQETVFDIAVPALRHAQDLALLWSPEPRLVDATVVTDAEDGHEIDRVTSYLGRLDIGWEDGGFQLNHKPCFLRLALQ
LacZ3_41647	DQETVFDIAVPALRHAQDLALLWSPEPRLVDATVVTDAEDGHEIDRVTSYLGRLDIGWEDGGFQLNHKPCFLRLALQ
LacZ3_NCB01004	DQETVFDIAVPALRHAQDLALLWSPEPRLVDATVVTDAEDGHEIDRVTSYLGRLDIGWEDGGFQLNHKPCFLRLALQ
LacZ3_THF56	-----
LacZ3_bja209	QGYWPDShLAASADELRDAELAKEAGLNGRLVHQKLEDPFRFLYWADRLGLMLWAEMPSAFAGTVMERVVREWTEAVS
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	QGYWPDShLAASADELRDAELAKEAGLNGRLVHQKLEDPFRFLYWADRLGLMLWAEMPSAFAGTVMERVVREWTEAVS
LacZ3_41647	QGYWPDShLAASADELRDAELAKEAGLNGRLVHQKLEDPFRFLYWADRLGLMLWAEMPSAFAGTVMERVVREWTEAVS
LacZ3_NCB01004	QGYWPDShLAASADELRDAELAKEAGLNGRLVHQKLEDPFRFLYWADRLGLMLWAEMPSAFAGTVMERVVREWTEAVS
LacZ3_THF56	QGYWPDShLAASADELRDAELAKEAGLNGRLVHQKLEDPFRFLYWADRLGLMLWAEMPSAFAGTVMERVVREWTEAVS
LacZ3_bja209	RDLShPSIVAWVPVNESWSTPNPALVPQQRHFIDSLYHLTKALDPSRPAVSNdgWEISAADINGVHDYTTQASVLRERYG
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	RDLShPSIVAWVPVNESWSTPNPALVPQQRHFIDSLYHLTKALDPSRPAVSNdgWEISAADINGVHDYTTQASVLRERYG
LacZ3_41647	RDLShPSIVAWVPVNESWSTPNPALVPQQRHFIDSLYHLTKALDPSRPAVSNdgWEISAADINGVHDYTTQASVLRERYG
LacZ3_NCB01004	RDLShPSIVAWVPVNESWSTPNPALVPQQRHFIDSLYHLTKALDPSRPAVSNdgWEISAADINGVHDYTTQASVLRERYG
LacZ3_THF56	RDLShPSIVAWVPVNESWSTPNPALVPQQRHFIDSLYHLTKALDPSRPAVSNdgWEISAADINGVHDYTTQASVLRERYG
LacZ3_bja209	HASLRQGEFTDPWPgAKRLLLPgVLHQQGPVVLSEFGGTTFFEPAGEAWFGYDTVVTREYAERLSSlVEAAVDSGLAGF
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	HASLRQGEFTDPWPgAKRLLLPgVLHQQGPVVLSEFGGTTFFEPAGEAWFGYDTVVTREYAERLSSlVEAAVDSGLAGF
LacZ3_41647	HASLRQGEFTDPWPgAKRLLLPgVLHQQGPVVLSEFGGTTFFEPAGEAWFGYDTVVTREYAERLSSlVEAAVDSGLAGF
LacZ3_NCB01004	HASLRQGEFTDPWPgAKRLLLPgVLHQQGPVVLSEFGGTTFFEPAGEAWFGYDTVVTREYAERLSSlVEAAVDSGLAGF
LacZ3_THF56	HASLRQGEFTDPWPgAKRLLLPgVLHQQGPVVLSEFGGTTFFEPAGEAWFGYDTVVTREYAERLSSlVEAAVDSGLAGF
LacZ3_bja209	CFTQFTDTEQETNGLFTADRTPKLPpAELRAILTRPRRG
LacZ3_4-3	-----
LacZ3_DSM40199	CFTQFTDTEQETNGLFTADRTPKLPpAELRAILTRPRRG
LacZ3_41647	CFTQFTDTEQETNGLFTADRTPKLPpAELRAILTRPRRG
LacZ3_NCB01004	CFTQFTDTEQETNGLFTADRTPKLPpAELRAILTRPRRG
LacZ3_THF56	CFTQFTDTEQETNGLFTADRTPKLPpAELRAILTRPRRG

Рисунок 3.3 – Выравнивание аминокислотных остатков белка фермента β -галактозидазы филогенетически близких штаммов *S. globisporus*. Выравнивание демонстрирует, что ключевые каталитические остатки Glu160 и Glu358 (выделены красным) идентичны у всех штаммов, что указывает на важную роль в функционировании фермента, которая была сохранена в ходе эволюции [171]

Примечательной особенностью *S. globisporus* bja209 в сравнении с близкородственными штаммами является неспособность метаболизировать до кислот галактозу и арабинозу, что также обусловлено геномными свойствами. Основой метаболизма галактозы является ее поэтапная конвертация в α -D-glucose-1-phosphate при участии ферментов пути Лелуара и включают ферменты: альдоза-1-эпимераза, галактокиназа, УДФ-уридилитрансфераза и УДФ-глюкозо-4-эпимераза [172]. В геноме обоих штаммов присутствуют все компоненты данного метаболического пути, однако в геноме *S. globisporus* 4-3 представлено 2 варианта генов фермента галактокиназы, может косвенно влиять на более эффективную утилизацию данного субстрата.

Метаболизм арабинозы в клетках грамположительных бактерий, включая актиномицетов, заключается в конвертации L-арабинозы в ксилозо-5-фосфат и последующем метаболизме ксилозы. Поскольку, представленные близкородственные штаммы способны метаболизировать ксилозу, основные отличия связаны с ферментами конвертации арабинозы, а именно: арабиноза-изомераза (AraA), рибулокиназа (AraB), рибулозо-5-фосфат-4-эпимераза (AraD) [173]. В результате сравнительного геномного анализа штаммов, была выявлена 100% гомология, как кодируемых аминокислотных последовательностей, так и промоторных последовательностей. Таким образом различия в метаболизации арабинозы лежит не в их структуре, а в каких-то других факторах. Важным фактором в метаболизации арабинозы является её регуляция через транскрипционный фактор – репрессор AraR, который в норме связывается с регуляторными участками ДНК и препятствует транскрипции генов катаболизма арабинозы. Репрессия снимается в присутствии субстрата. В случае повышенного содержания araR в клетке подавление может быть слишком сильным и транскрипция генов, находящихся под контролем данного регулятора, может не происходить. Выравнивание нуклеотидных последовательностей промоторной области репрессора AraR отражено на Рисунке 3.4.

Bja209_p_araR3	GCCGGT----GAGATTGCAGCAATCAATCTCTTGCCTCAACCACTTGGCGGTGCTTTTGTAAACCCAGCGTCAAGAAATG
4-3_p_araR3	CTTCGAGGTCCGGGACGCCGCTCCGGATTTCCTTCATCGCATCTCTCCACCCCAATTCATTCTCTTAAAGGAATGAATTT
DSM40199_p_araR3	CTTCGAGGTCCGGGACGCCGCTCCGGATTTCCTTCATCGCATCTCTCCACCCCAATTCATTCCCTTGAAGGAATGAATTT
	1 -10 -35
Bja209_p_araR3	CGGAAATTCATTCTTTTAAGGGAATGAATGGGTGGGAGAA--TGCGATGAAGGAAATCCGGAGCGGCGTCCCGGACCT
4-3_p_araR3	CCGCATTCTTGACGCTGG-GGTTACAAA-AGCACCGCCCAAGTGGTTGACGCAAGAGATTGATTGCTGCAATCTC----A
DSM40199_p_araR3	CCGCATTCTTGACGCTGG-GGTTACAAA-AGCACCGCCCAAGTGGTTGACGCAAGAGATTGATTGCTGCAATCTC----A
Bja209_p_araR3	CGAAG
4-3_p_araR3	CCGGC
DSM40199_p_araR3	CCGGC

Рисунок 3.4 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей регуляторной области белка репрессора – AraR, участвующего в негативной регуляции метаболизма арабинозы. Выравнивание демонстрирует консервативные операторные сайты (подчеркнуты) для связывания репрессора AraR и основные элементы промотора (-10/-35, выделены жирным шрифтом). Однонуклеотидные полиморфизмы (синие) расположены в пределах этих функциональных областей, что указывает на потенциальное влияние на регуляцию метаболизма арабинозы [162]

Структура природных микробных сообществ, а также положение в ней каждого штамма во многом обусловлены профилем их устойчивости к антимикробным субстанциям. Помимо этого, необходимо помнить, что способность продуцировать то или иное вещество с антимикробной активностью вынуждает микроорганизм формировать собственную устойчивость к данной субстанции, это может как адаптивная мутация собственных внутриклеточных мишеней (если они конститутивно присутствуют), либо усиление эффлюксов. Таким образом изучение профиля антимикробной устойчивости может служить важным

инструментом изучения продуцентов антибиотиков. С помощью диско-диффузионного метода был исследован набор репрезентативных антибиотиков, отраженных в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Оценка устойчивости штамма bja209 к ряду антибиотиков с помощью диско-диффузионного метода

Название антибиотика	Размер зон в мм
Аминогликозидные антибиотики	
Амикацин, 30 мкг (AK 30)	33
Гентамицин, 10 мкг (CN 10)	20
Канамицин, 50 мкг (KM 50)	27
Стрептомицин, 2000 мкг (S 2000)	–
Стрептотрицин, 72 мкг (ST 72)	–
Тобрамицин, 10 мкг (TOB 10)	22
Бета-лактамы/Бета-лактамы + ингибитор бета-лактамаз	
Азтреонам, 30 мкг (ATM 30)	–
Амоксициллин/клавулановая кислота, 30 мкг (AMC 30)	10
Ампициллин, 100 мкг (AMP 100)	–
Дорипенем, 8 мкг (DOR 8)	–
Меропенем, 15 мкг (MEM 15)	–
Оксациллин, 5 (Ox 5)	–
Пенициллин, 100 мкг (PEN 100)	–
Тазобактам, 110 мкг (TPZ 110)	–
Цефепим, 30 мкг (FER 30)	–
Цефалоспорины	
Цефокситин, 30 мкг (FOX 30)	–
Цефтазидим, 30 мкг (CAZ 30)	–
Цефалоспорины	
Триметоприм, 25 мкг (TMP 25)	–
Триметоприм-сульфаметоксазол, 25 мкг (SXT 25)	–
Гликопептиды	
Ванкомицин, 30 мкг (Va 30)	15
Прочие	
Клиндамицин, 2 мкг (DA 2) (Линкозамиды)	27
Эритромицин, 15 мкг (E15) (Макролид)	16
Рубомицин, 5 мкг (RB 5) (Антрациклины)	–

«--» - не наблюдается антагонистического действия.

Прежде всего, обращает на себя внимание устойчивость штамма к большинству исследованных беталактаменных антибиотиков, в том числе оксациллину и карбапенемам. При этом комбинация беталактама с ингибитором беталактамаз (клавулановой кислотой) оказывает подавляющее действие на штамм, что говорит об инактивации беталактамов под действием беталактамаз с широкой специфичностью, а не мутацией мишеней или изменением проницаемости мембраны.

В геноме штамма присутствуют 3 гена, кодирующих беталактамазы. Одна бета-лактамаза класса C, локализованная в центральной части хромосомы и способная инактивировать такие антибиотики, как: Пенициллины, Цефалоспорины и некоторые Карбапенемы. Помимо этого, в

терминальной части хромосомы присутствуют две копии бета-лактамаз класса А, при этом одна из них синтезируется в неактивной форме и посредством посттрансляционной модификации приобретает активную форму.

Помимо этого, для штамма характерна чувствительность к большинству протестированных аминогликозидных антибиотиков, но при этом наблюдается устойчивость к стрептомицину и стрептотрицину. Устойчивость к стрептомицину обусловлена возможной мутацией S12 белка малой субчастицы рибосомы, либо наличием в геноме модифицирующих ферментов. Анализируя геном штамма bja209 на предмет наличия одного из перечисленных механизмов устойчивости было выявлено, что в гене *rpsL* отсутствуют точечные мутаций, однако присутствует фермент аминогликозид аминотрансфера, инактивирующая антибиотик. Демонстрируемая устойчивость штамма к стрептотрицину, обусловлена наличием специфического гена фермента стрептотрицин ацетилтрансферазы, который при этом не имеет перекрестной устойчивости с другими аминогликозидами.

Устойчивость штамма к синтетическим сульфаниламидным соединениям обусловлена генами – *sul1* и *sul2*, кодирующими инактивирующие ферменты дигидроптеорат синтазы, две копии которых представлены в геноме штамма.

Далее, обращает на себя внимание разнообразная чувствительность к фторхинолонам, устойчивость к норфлоксацину, особенно учитывая тот факт, что мишень действия фторхинолонов (ДНК-гираза и топоизомеразы IV) способны обуславливать СОС-ответ, наблюдавшийся нами в первичных тестах. Представленные в таблице 3.3 фторхинолоны – синтетические соединения и наблюдаемые различия являются типичными для представителей вида *S. globisporus* в виду специфических мутаций в ДНК-гиразе и топоизомеразе IV.

Таким образом, демонстрируемый профиль устойчивости штамма bja209 к ряду β -лактамов, аминогликозидов, сульфаниламидных и фторхинолоновых антибиотиков ассоциирована с работой модифицирующих ферментов, либо функционированием эффлюксных насосов.

3.3.3. Идентификация антибиотических компонентов штамма

Streptomyces globisporus bja209

В ходе первичного скрининга *S. globisporus* bja209, выращенного на разных плотных питательных средах ISP, была детектирована различная антагонистическая активность в отношении тест-штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC. У данного тест-организма нарушена система эффлюкса, что приводит к ослаблению защитных механизмов клетки и увеличению чувствительности к антибактериальным веществам. За счет этого увеличивается вероятность

обнаружения новых метаболитов, способных воздействовать на внутриклеточные компоненты. Метаболит, выделяемый *S. globisporus* bja209 на средах ISP3 и ISP5 индуцировал SOS-ответ, а на среде ISP6 не вызывал индукцию репортёрного сигнала, что показано на Рисунке 3.5.

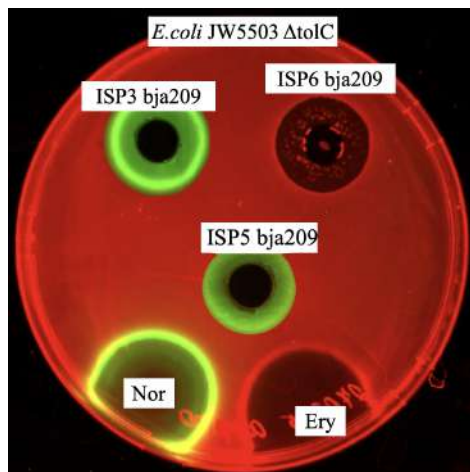


Рисунок 3.5 – Активность КЖ штамма bja209 в отношении тест-штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC pDualrep2. В качестве положительных контролей 0,05 мкг эритромицина (вызывает экспрессию Katushka2S) и 1 мкг норфлоксацина (вызывает экспрессию TurboRFP). Для удобства сигналы Katushka2S и TurboRFP визуализируются программным обеспечением ChemiDoc MP красным и зеленым цветом

В первичных концентратах КЖ, подавляющих трансляцию, посредством ВЭЖХ-ХМСА был детектирован Альбомицин δ 2, а в КЖ, индуцирующей СОС-ответ был обнаружен метаболит С-1027, что согласовывалось с данными, полученными на основе анализа биосинтетических кластеров с помощью antiSMASH.

Были произведены дополнительные очистки активных КЖ с помощью ТФЭ и ВЭЖХ, с последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом (ХМСА) активных ВЭЖХ-фракций. Фракция, полученная на среде ISP6 и подавляющая трансляцию содержала метаболит, который ионизируется в режиме регистрации положительных ионов и дает интенсивные аддукты $[M+H]^+$ и $[M+2H]^+$ 1046,309095 и 523,659953, соответствующие моноизотопной массе 1045,3047 Да. С учетом характерного спектра поглощения (278 нм) для выделенного соединения, в базах NPAtlas, Dictionary of Natural Products и PubChem был выявлен кандидат с брутто-формулой $C_{37}H_{52}FeN_{12}O_{18}S$, что соответствует молекуле Альбомицина δ 2. Условия хроматографического разделения Альбомицина δ 2 представлены на Рисунке 3.6.

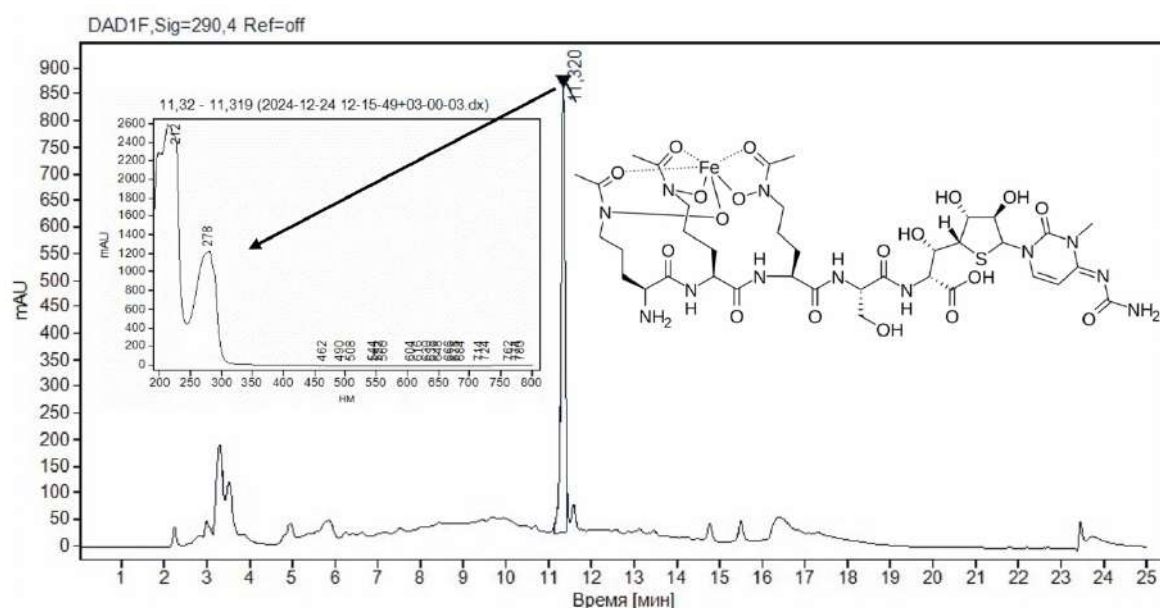


Рисунок 3.6 – Хроматограмма ВЭЖХ, показывающая очистку Альбомуцина $\delta 2$. Условия хроматографического разделения, где подвижная фаза А) Вода; В) Ацетонитрил. Градиент: 5-20% В (0-3 мин), 20-60% В (3-9 мин), 60-95% В (9-12 мин), 95% В (12-16 мин); скорость потока: 1,0 мл/мин; детектирование: 290 нм

Соединение, получаемое на жидкой среде ISP3, индуцирующее СОС-ответ, в ходе ТФЭ элюировалось во фракциях, содержащих 20-30% ацетонитрила. Дополнительное ВЭЖХ-фракционирование и ХМСА анализ фракции, показало, что в массспектрах не детектируются ожидаемые ионы соединения С-1027. Вместо них в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов наблюдались интенсивные аддукты $[M+H]^+$ и $[M-H]^-$ 601,259708 и 599,346364, соответствующие моноизотопной массе 600,3483 Да. С учетом характерного спектра поглощения 272 нм, в базах NPAtlas, Dictionary of Natural Products и PubChem был выявлен кандидат с брутто-формулой $C_{27}H_{48}N_6O_9$, соответствующий молекуле Дефероксамина Е. Условия хроматографического разделения Дефероксамина Е показаны на Рисунке 3.7.

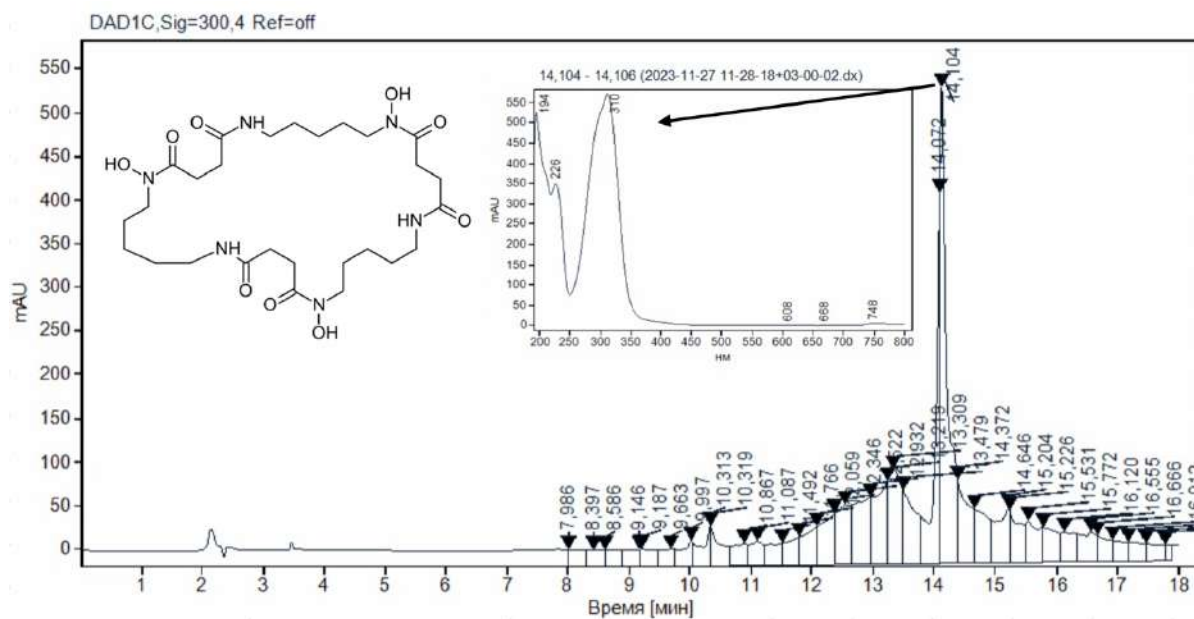


Рисунок 3.7 – ВЭЖХ-анализ фракции, содержащей Дефероксамин Е. Разделение проведено с использованием градиентного элюирования подвижной фазой А (вода) и В (ацетонитрил) при скорости потока 1,0 мл/мин. Программа градиента была следующей: 5-20% В (0-3 мин), 20-60% В (3-9 мин), 60-95% В (9-12 мин) и 95% В (12-16 мин). Детектирование проводили при длине волны 272 нм

Дефероксамины являются активными хелаторами, поэтому для дополнительного подтверждения идентификации был проведен тест на его хелатирующую способность. Активный метаболит на плотной среде с добавлением хромазуrolа демонстрировал формирование оранжевого ореола, что говорит о хелатирующих свойствах тестируемого вещества, способного удалять железо из комплекса хромазуrol-железо, что показано на Рисунке 3.8.

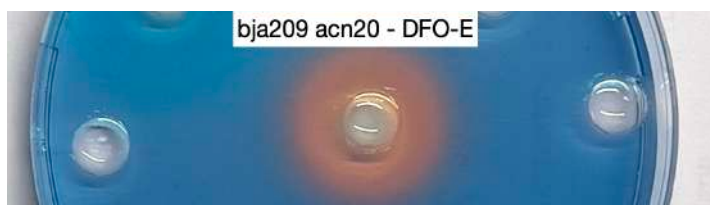


Рисунок 3.8 – Чашка с плотной агарозной средой и хромазулом S (CAS) для определения железо-хелатирующей активности Дефероксамина Е. Образование отчетливого оранжевого ореола показывает наличие сидерофора, способного удалять железо из синего комплекса CAS-Fe (III)

Таким образом было установлено, что соединение, вызывающее индукцию СОС-ответа обусловлено молекулой Дефероксамина Е.

Ранее в литературе сообщалось об антагонистическом действии Дефероксамина Е на *M. smegmatis* [175, 176], однако об индукции СОС-ответа информации не было и механизм антагонистического действия соединения в целом - не исследован. В наших тестах фракция с Дефероксамином Е показала активность в отношении клинического изолята *A. baumannii* blaNDM, а также в отношении фитопатогенного образца *Clavibacter michiganensis* (Таблица 3.4), на другие тест-объекты эффекта не обнаружилось. Это говорит о весьма узком спектре активности, что может объяснять факт того, что данное соединение не привлекает внимание исследователей. Результаты скрининга антимикробного действия представлены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Антагонистическая активность метаболитов штамма bja209 к клинически релевантным бактериальным патогенам. Размер зоны ингибирования роста, мм

Название штамма	Альбомицин $\delta 2$	Дефероксамин Е
<i>K. pneumoniae</i> blaVIM-1	15	—
<i>K. pneumoniae</i> blaOXA-48	11	—
<i>K. pneumoniae</i> blaKPC-3	16	—
<i>K. pneumoniae</i> blaOXA-244	18	—
<i>K. pneumoniae</i> blaNDM-1+blaOXA-48	18	—
<i>K. pneumoniae</i> blaNDM-1	15	—
<i>K. pneumoniae</i> blaNDM-5	11	—
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	12	—
<i>K. pneumoniae</i> 107210323	19	—
<i>K. pneumoniae</i> 53130623	20	—
<i>K. pneumoniae</i> 77270223	21	—
<i>K. pneumoniae</i> 60130323	22	—
<i>K. pneumoniae</i> 152310323	23	—
<i>K. pneumoniae</i> 12-13-14040423	24	—
<i>K. pneumoniae</i> 83180423	25	—
<i>K. pneumoniae</i> 9030923	26	—
<i>E. coli</i> mcr-1.1	18	—
<i>E. coli</i> blaVIM-1	18	—
<i>E. coli</i> ATCC 35218	18	—
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11	—
<i>Acinetobacter baumannii</i> blaOXA-23+ blaOXA-72	—	—
<i>A. baumannii</i> blaOXA-23	—	—
<i>A. baumannii</i> blaOXA-72	—	—
<i>A. baumannii</i> blaNDM	—	12
<i>Enterococcus faecium</i>	—	—
<i>S. aureus</i> ORGID 90449	10	—
<i>S. aureus</i> MRSA	11	—
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	11	—
<i>S. aureus</i> INA 00761	21	—
MRSA 69181223_005	30	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> blaGES-5	—	—
<i>P. aeruginosa</i> blaVIM	—	—
<i>P. aeruginosa</i> blaVIP+blaIMP	—	—
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	—	—
<i>P. aeruginosa</i> GIMC5015:PAKB6/2014	27	—

«--» - не наблюдается чувствительности патогенных штаммов.

3.3.4. Определение регуляторного фактора, влияющего на индукцию биосинтеза

Как было отмечено выше, первоначально различная индукция репортёра, а соответственно переключение синтеза разных антибиотиков отмечались при культивировании *S.globisporus* bja на средах ISP3 и ISP6. Для определения ключевого фактора, ответственного за переключение между синтезами различных метаболитов, был поставлен эксперимент с синтетическими средами, составленными из различных компонентов, входящих в состав ISP3 и ISP6. Полна среда включала: растворимый крахмал, KNO₃, MgSO₄, цитрат железа, пептон, гидролизат казеина, K₂HPO₄. В вариантах-производных исключали по одному компоненту, для выявления влияющего фактора. Подробная схема эксперимента приведена в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Матрица, отражающая вариации компонентов питательных сред для выявления компонента-индуктора

[illegible]

Полученные КЖ тестировали на репортёрном штамме, результаты приведены на Рисунке 3.9, подвергали препаративной ТФЭ и масс-спектрометрическому анализу для обнаружения целевых метаболитов.

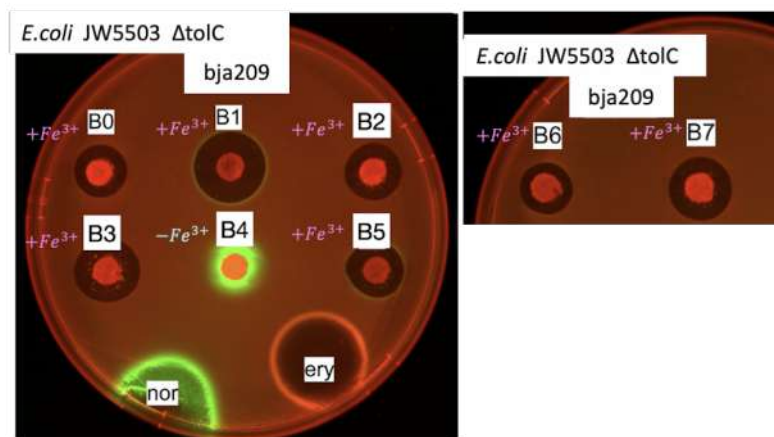


Рисунок 3.9 – Активность культуральных жидкостей штамма bja209 в отношении тест - штамма *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, оснащенной двойной репортёрной системой pDualrep2. В качестве положительных контролей на чашки были нанесены 0,05 мкг эритромицина (ингибитор биосинтеза белка), который вызывает экспрессию Katushka2S и 1 мкг норфлоксацина (ингибитор ДНК-гиразы), который вызывает экспрессию TurboRFP

В результате было установлено, что основным фактором влияющим на переключение между синтезом целевых веществ является железо. Наличие в среде 0,2мМ железа в форме цитрата подавляло синтез Дефероксамина Е, но наблюдалось образование Альбомицина $\delta 2$. В случае если железо дополнительно не вносилось (сверх того, что присутствовало в следовых количествах в прочих компонентах сред), детектировалась устойчивая продукция Дефероксамина Е.

Железо является важным, часто критическим микроэлементом необходимым для жизнедеятельности микроорганизмов. В клетках бактерий активный транспорт трехвалентного железа (Fe^{3+}) осуществляется посредством сидерофорных молекул, синтезируемых и выделяемых микроорганизмами [177]. Специфичная молекула-хелатор, экскретированная микроорганизмом связывает Fe^{3+} ион во внешней среде, затем посредством мембранных транспортных белков проникает в клетку, где происходит окислительно-восстановительная реакция с восстановлением железа до Fe^{2+} иона, с последующей экскрецией сидерофора за новой порцией Fe^{3+} [178, 179].

Поступившее в клетки железо активно включается в биохимические процессы, при этом его избыток способен взаимодействовать в качестве регуляторного фактора с группой белков DmdR (divalent metal-dependent regulatory) [180]. Данные белки имеют высокое сродством к

двухвалентным ионам металлов и в таком Ме-связанном состоянии выступают в роли транскрипционных факторов - ингибиторов транскрипции.

В ходе исследования геномного окружения кластера Дефероксамина Е и Альбомуцина $\delta 2$ на наличие регуляторных участков, обуславливающих индуцирующий эффект на биосинтез данных соединений был выявлен подобный участок, вблизи промоторной области генов кластера дефероксамина Е [180, 181]. В кластере Дефероксамина Е существует несколько целевых для DmdR палиндромных последовательностей – в промоторной области генов *desA* и тем самым, цитрат железа (или любые источники ионов железа) обладает опосредованным действием на биосинтез Альбомуцина $\delta 2$, путем подавления биосинтеза Дефероксамина Е DmdR регулятором. Что дает возможность детектировать противоположную активность на репортёрном штамме *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, которая ассоциирована с антагонистическим действием Альбомуцина $\delta 2$.

Как было упомянуто выше, БГК дефероксамина весьма распространен среди стрептомицетов и присутствует в геномах всех *S. globisporus* приведенных в Генбанке. Также он наличествует в геноме ранее исследованного нами *S. globisporus* 4-3 и имеет полную гомологию с кластером в *S. globisporus* bja209, но при этом два эти штамма производят различные метаболиты: Б и Е соответственно, а антагонистическая активность и индукция СОС-ответа детектируется только за одним из них (формой Е).

Описанный в литературе БГК дефероксаминов Е и Б включает 6 генов и полностью идентичен БГК в *S. globisporus* bja209 и *S. globisporus* 4-3, а также типовому представителю вида. 4 гена, участвующие в непосредственном синтезе молекул: *desA* – пиридоксаль зависимая декарбоксилаза; *desB* – монооксигеназа; *desC* – ацетилтрансфераза; *desD* – коровый фермент биосинтеза дефероксамина и 2 гена обеспечивают доставку и восстановление молекулы сидерофора: *desE* – липопротеиновый рецептор компонента ABC транспортера и *desF* – феррокамин-редуктаза [182, 183]. Выравнивание генов кластера Дефероксамина Е штамма bja209 и его филогенетически близких соседей отражено на Рисунке 3.10. Кластеры двух штаммов, наиболее филогенетически-близких к *S. globisporus* bja209 имеют дополнительный ORF, который не удастся четко аннотировать. Возможно он не вносит критического вклада в биосинтез.

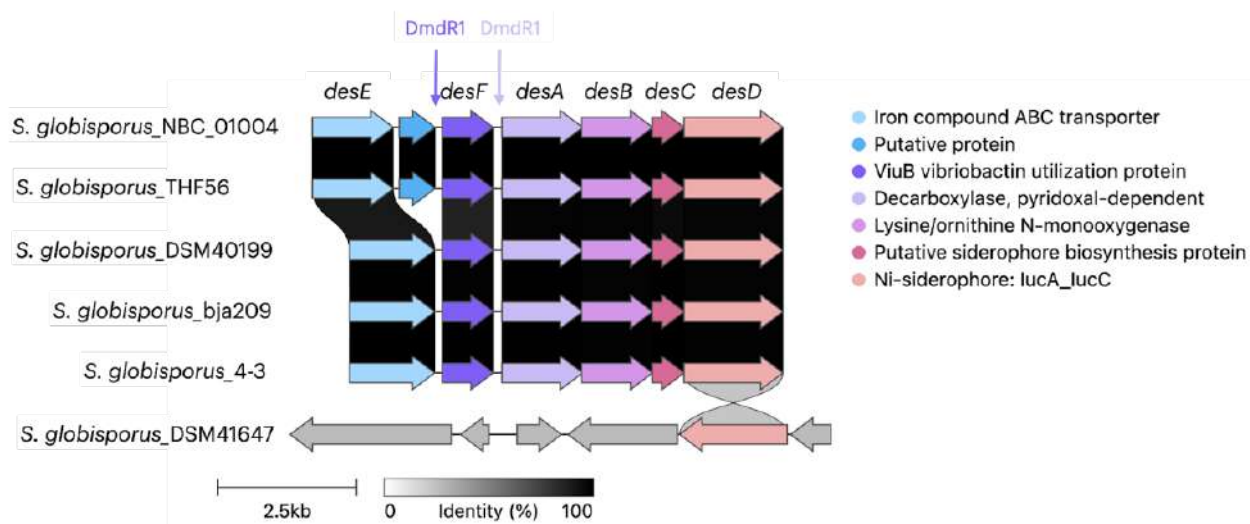


Рисунок 3.10 – Выравнивание БГК дефероксамина у филогенетически родственных штаммов *S. globisporus*. Гены, кодирующие ключевые биосинтетические ферменты (*desA* – декарбоксилаза; *desB* – монооксигеназа; *desC* – ацилтрансфераза, *desD* – синтетаза), высококонсервативны

Процесс биосинтеза молекул Дефероксамина Е и Б происходит по общему NRPS - независимому пути (NIS) и задействует одни и те же ферменты [184]. Предшественником для обеих сидерофоров выступает молекула L-лизина, которая под действием декарбоксилазы (*DesA*) и монооксигеназы (*DesB*) преобразуется в N-гидрокикадаверин. Основное различие в структуру дефероксаминов вносит реакция катализируемая ацетилтрансферазой (*DesC*), заключающееся в N-ацилировании интермедиата N-гидрокикадаверина, молекулами ацетил-CoA или сукцинил-CoA, с последующей сборкой молекул дефероксаминов посредством NRPS - независимой сидерофор синтетазы (*DesD*) [185]. Опираясь на данные о пространственных структурах молекул Дефероксамина Е и Б, можно предположительно выделить их структурные единицы для Дефероксамина Е, индуцирующий SOS-ответ на репортёрном штамме, это остатки N-гидрокси-N-сукцинилкадаверина. А в случае Дефероксамина Б, за которым не наблюдается антагонистической активности, молекула представлена гомодимером N - гидроксид - N - сукцинилкадаверина и N-гидрокси-N-ацетилкадаверином [195].

Было выдвинуто предположение, связанное с тем, что за биосинтез Дефероксамина Б или Е отвечает внутриклеточный уровень сукцинил-CoA или ацетил-CoA, уровень которых обеспечивают сторонние процессы, однако в рамках данного исследования у нас не было возможности проверить данную гипотезу, это станет предметом дальнейших исследований.

Влияние ионов железа в среде на экспрессию генов, было исследовано с помощью ОТ - ПЦР. Для этого была выделена и очищена тотальная РНК, с которой получали кДНК идентифицированных регионов дефероксаминового кластера, с последующей амплификацией

генов. ОТ-ПЦР была поставлена с РНК штамма *S.globisporus* bja209, выращенного на средах В0, В1 и В4, компоненты представлены в Таблице 3.5, где наблюдалась и не проявлялась активность Дефероксамина Е. Результаты представлены на Рисунке 3.11.

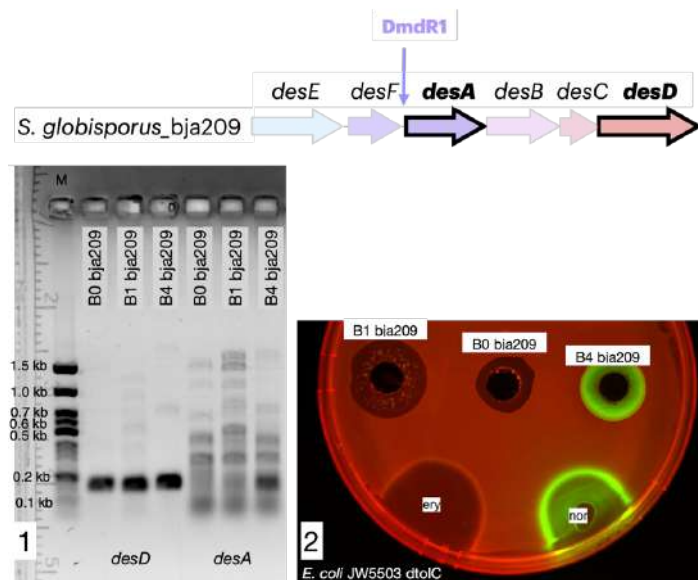


Рисунок 3.11 – 1) Электрофореграмма ампликонов, полученных в результате ОТ-ПЦР. Результат указывает на то, что экспрессия гена *desA* (кодирующего ключевой биосинтетический фермент) подавлена в средах, обогащенных железом (В0, В1), и активирована в среде с дефицитом железа (В4); 2) Антибактериальная активность КЖ в отношении тестового штамма *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$. Активность наблюдается только в условиях, индуцирующих экспрессию гена *desA* (В4)

Результаты показывают, что на всех средах идет транскрипция гена *desD*, в присутствии цитрата железа (среды В0 и В1) отсутствует транскрипция *desA*, который непосредственно отвечает за формирование структуры молекулы Дефероксамина. Транскрипция *desA* наблюдается только на среде В4, в которой отсутствует цитрат железа. Такие данные были получены и для штамма 4 - 3. Результаты на Рисунке 3.12.

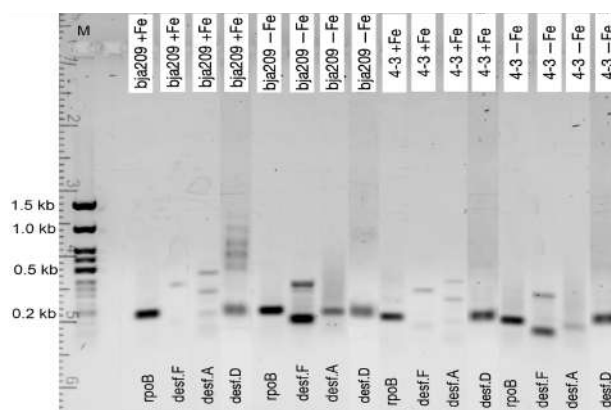


Рисунок 3.12 – Анализ экспрессии генов БГК Дефероксамина Е в штаммах *S. globisporus* bja209 и 4 - 3 с помощью ОТ-ПЦР: 1) ДНК маркер; 2-7) Штамм bja209, выращенный на среде с добавлением ионов железа (В1) и без добавления ионов железа (В4); 8 - 16) Штамм 4 - 3, выращенный в таких же условиях. В качестве положительного контроля ген *ropB*

Таким образом подтверждается роль регулятора DmdR в регуляцию экспрессии генов кластера Дефероксамина Е. В присутствии избытка ионов железа транскрипция части генов, ответственных за образование молекулы тормозится, при этом экспрессия вспомогательных генов, ответственных за транспорт и т.д. – продолжается.

3.3.5. Кластер биосинтеза Альбомицина $\delta 2$ и С-1027 и их распространенность среди видов

Соединение названное «Альбомицин» было выделено еще в середине XX века из штамма *S. griseus* [186]. Оно характеризовалось широким спектром антагонистической активности в отношении грамположительных и грамотрицательных клинически релевантных бактериальных патогенов, а также способностью взаимодействовать с ионами металлов, в частности – железом. Долгое время на основе именно этих признаков (антимикробный спектр, хелатирующие свойства) метаболиты, выделяемые многими видами стрептомицетов относили к «альбомицинам». Таким образом сформировалось представление о повсеместной и межвидовой распространенности продуцировать «Альбомицины» [187]. В 1949 году была предложена структура молекулы, выделенной из штамма *S. subtropicus* (ранее известный как *Actinomyces subtropicus*), а в 2012 году был описан биосинтетический кластер в штамме *S. griseus* ATCC 700974 [188, 189].

Альбомицин $\delta 2$ относится к группе сидеромицинов, пространственная структура которого имеет дифференциацию на сидерофорную компоненту – три- N^5 -гидрокси- N^5 -ацетил-L-орнитин и 4'-тиоксифуранозил пиримидиновую часть, которые связаны между собой пептидной связью

посредством сирилового аминокислотного остатка [190]. Группа сидеромицинов привлекает с точки зрения проникающей способности в бактериальные клетки благодаря наличию сидерафорной части, обуславливающей связывание трехвалентного железа. Ранее считалось, что антибактериальный эффект Альбомицина $\delta 2$ связан с тем что он «мимикрирует» некоторые из интермедиатов дыхательной цепи и тем самым ингибирует бактериальный метаболизм [187], но в 2000 году было установлено, что Альбомицин $\delta 2$ действует по значительно более сложному механизму, так как структурно состоит из сидерафорной и антибиотической частей (4' - тиоксифуранозил пиримидин), соединенных амидной связью. При попадании внутрь чужеродной клетки амидная связь гидролизуется внутриклеточной пептидазой (*pepN*) с образованием антибиотика SB-217452, обладающем ингибирующем эффектом на серил-тРНК - синтазу [191, 192]. В литературе такой механизм действия описывается как «Эффект троянского коня», поскольку бактериальная клетка посредством активного транспорта *fur* системы поглощает молекулу Альбомицина $\delta 2$ и активирует антибиотические свойства соединения.

В ходе скрининга антибактериальных субстанций, нашей группой был во второй раз выделен и идентифицирован продуцент Альбомицина $\delta 2$, относящийся к виду *S. globisporus*. Важно отметить, что протестированные нами несколько тысяч продуцентов антибиотиков не обладали способностью синтезировать Альбомицин $\delta 2$, что не согласуется с устоявшейся тенденцией о том, что синтез данной молекулы широко распространен среди видов стрептомицетов. Для этого был произведен анализ полногеномных последовательностей, опубликованных в ГенБанке, видов стрептомицетов на наличие БГК, для которых отмечалась способность продуцировать Альбомицин $\delta 2$. На Рисунке 3.13 показано, что БГК, содержащие гены, необходимые для синтеза Альбомицина $\delta 2$ присутствуют только у ряда штаммов, принадлежащих к виду *S. globisporus*.

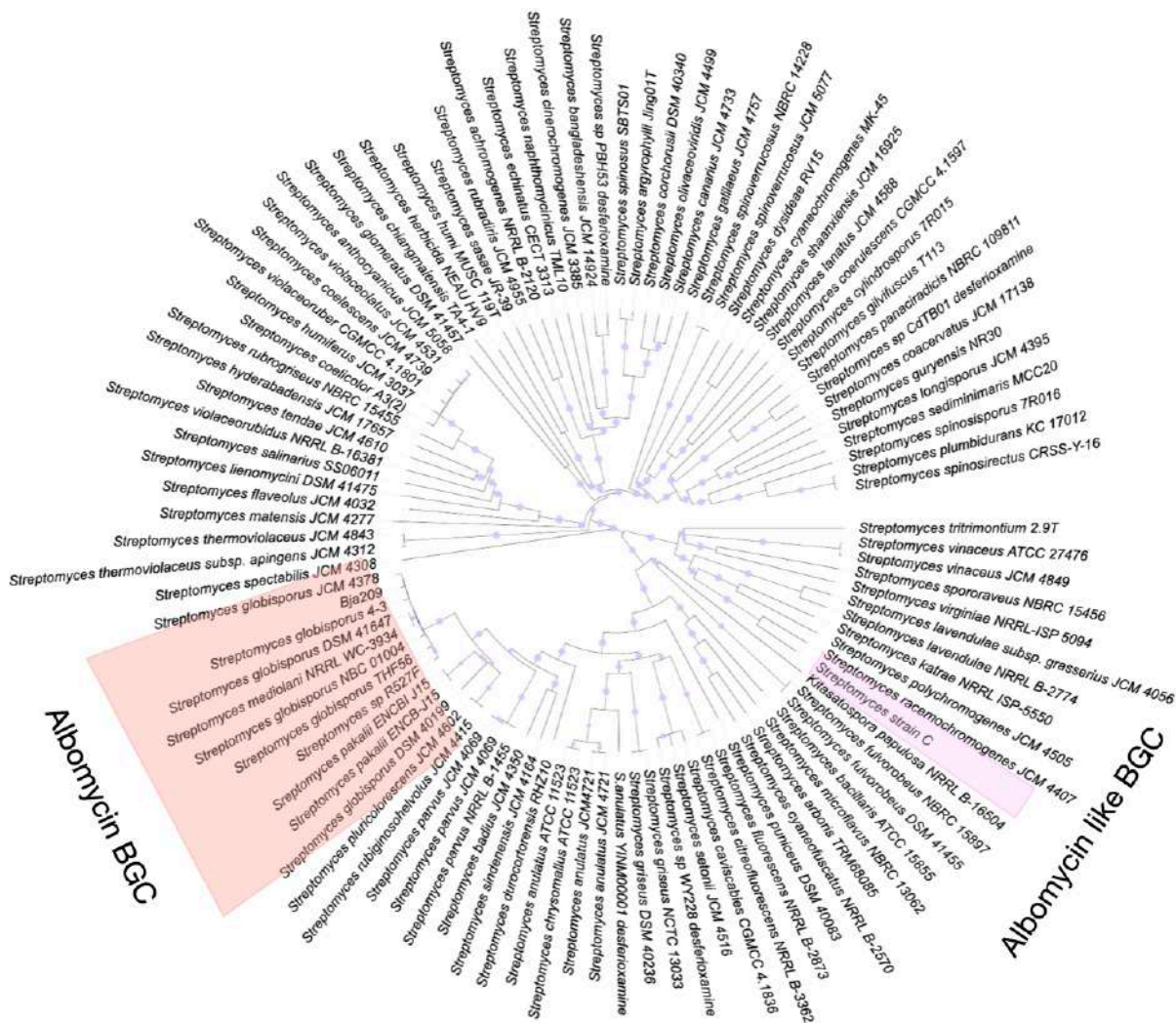


Рисунок 3.13 – Филогенетическое дерево родственных штаммов, демонстрирующее распределение БГК Альбомуцина внутри клады *S. globisporus*. Филогенетическое дерево показывает эволюционные взаимосвязи между различными типовыми штаммами *Streptomyces*

Как было описано ранее, референсный БГК Альбомуцина δ2 был изучен и подробно описан в штамме *Streptomyces sp.* ATCC700974. Полный геном данного продуцента не был опубликован авторами в базе данных Генбанк, что не позволяет провести филогенетических анализ и определить видовую принадлежность штамма. Первоначально штамм ATCC 700974 был выделен и помещен в международную коллекцию З. Ваксаманом и коллегами, которые атрибутировали данного представителя в своих публикациях как *S. griseus*, на основе фенотипических признаков, однако согласно современной классификации скорее всего данный штамм также относится к *S. globisporus*.

Выравнивание всех доступных для анализа БГК Альбомидина $\delta 2$, представленных на Рисунке 3.14, показало, что гены БГК имеют высокий уровень гомологии, небольшие различия имеют гены ответственные за транспорт, вероятно как следствие их адаптационной изменчивости. Обращает на себя внимание гены *albR* и *albN*, а также *albP* и *albO*, которые,

вероятно, в ходе эволюции произошли в результате копирования от общего предшествующего гена с последующей дивергенцией, что привело к формированию функционально связанных, но структурно обособленных генов.

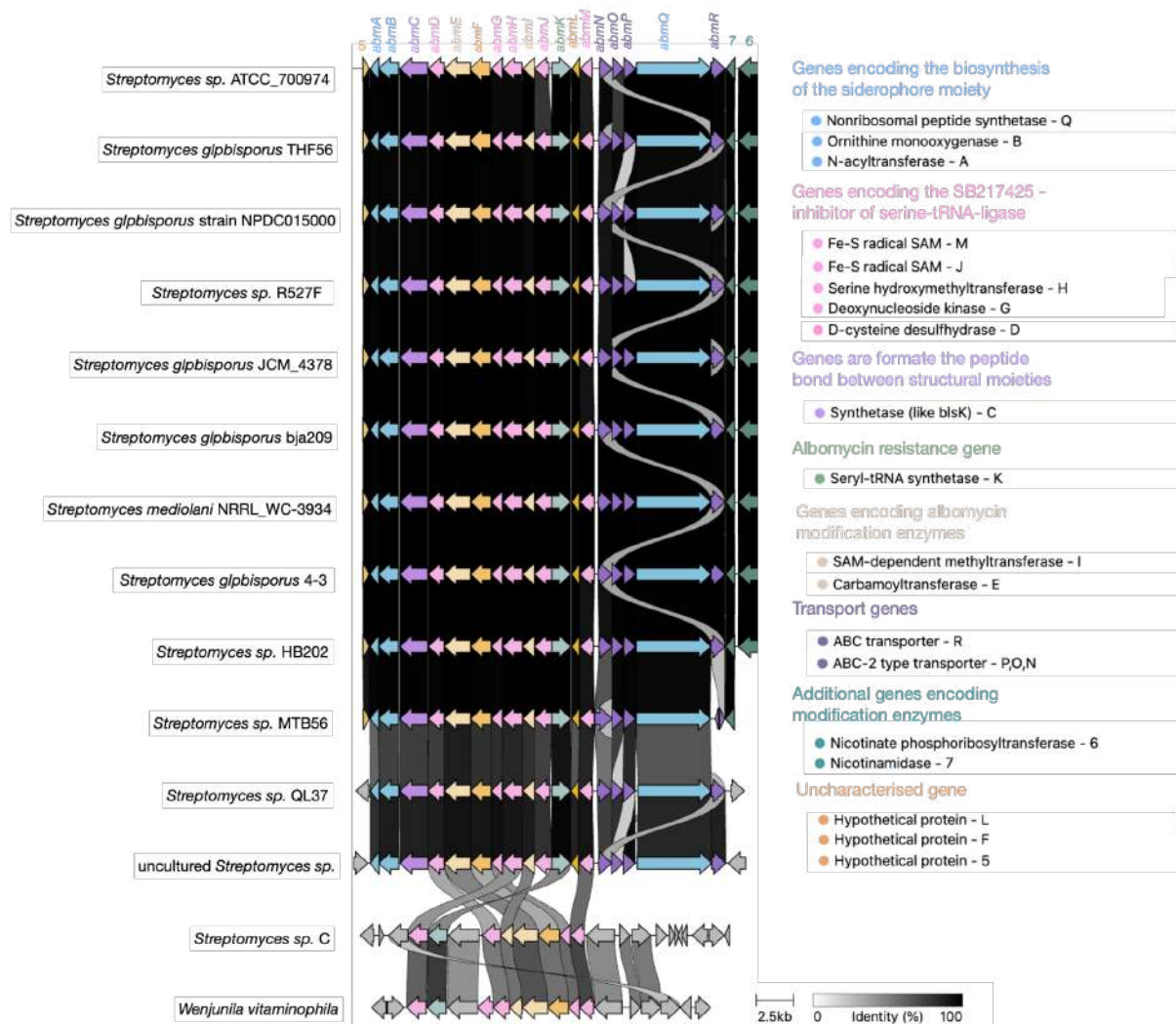


Рисунок 3.14 – Сравнительная карта выравнивания БГК Альбомицина у родственных штаммов *S. globisporus*. Синим и розовым цветом выделены основные гены биосинтеза антибиотика, фиолетовым отмечены гены, кодирующие транспортёры, зеленым отмечены гены резистентности

Интересно отметить, что на Рисунке 3.14 мы видим у штаммов с авторскими наименованиями MTB56 и QL37, которые филогенетически также принадлежат к таксону *S. globisporus* частично деградированные – неполноценные БГК Альбомицина $\delta 2$. Также в Генбанк представлены штаммы *S. globisporus*, в которых БГК Альбомицина $\delta 2$ полностью отсутствует, но при этом наличествуют четкие гомологичные фрагменты, которые фланкируют БГК Альбомицина $\delta 2$ в его носителях, что отражено на Рисунке 3.15.

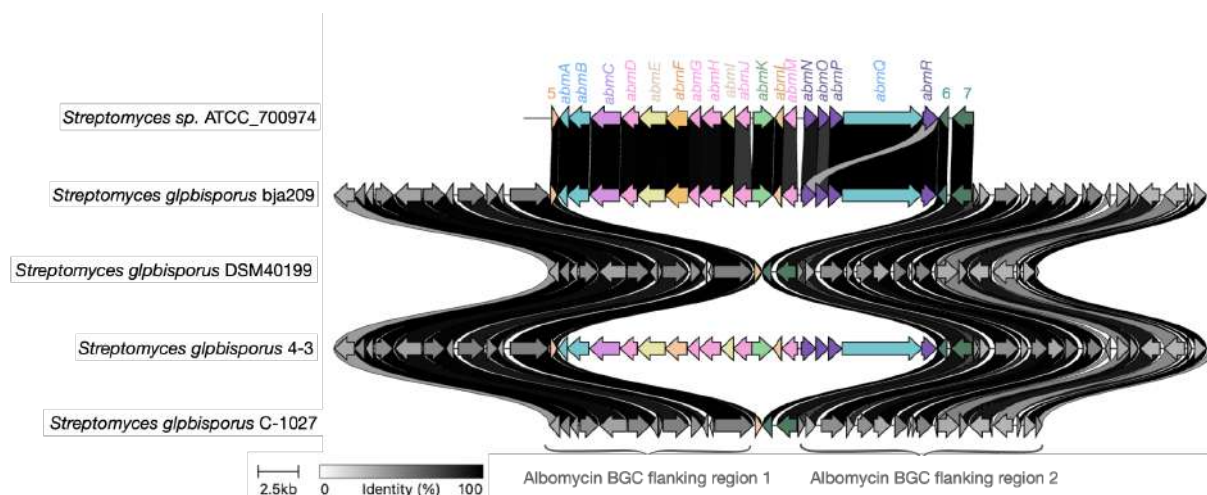


Рисунок 3.15 – Выравнивание хромосомного региона, содержащего биосинтетический генный кластер (БГК) Альбომидина у продуцирующих штаммов, в сравнении с гомологичным сайтом без вставки у непродуцирующих штаммов *S. globisporus*

Таким образом, можно предположить, что кластер Альбомидина $\delta 2$ был сформирован в некоем предшественнике, а затем посредством горизонтального переноса генов попал в один из штаммов *S. globisporus* и далее подвергся незначительным мутациям, затронувшим прежде всего транспортные гены, но не коровые гены биосинтеза и структуру кластера. В случае формирования кластера непосредственно в *S. globisporus*, наблюдалось бы постепенное увеличение количества различных генов в определенном локусе, а в данном случае мы на основе широкой выборки природных изолятов видим единовременную вставку целого кластера.

Как было описано ранее, помимо Альбомидина $\delta 2$, также Сальмицин (salmycins) и Ферримидин (ferrimycins) [192, 193] являются представителями группы сидеромицинов. Данные молекулы несут в своих структурах составные части, которые в результате высвобождения за счет ферментативного гидролиза становятся ингибиторами серил-тРНК-синтетазы, при этом их химическая структура существенно отличается от Альбомидина $\delta 2$. К сожалению для них не опубликованы кластеры биосинтеза. Также есть и другие сидеромицины – Микроцин С (microcin C) и Агроцин 84 (agrosin 84) - ингибиторы аспартил-тРНК-синтетазы и лейцил-тРНК-синтетазы соответственно [194].

Устойчивость продуцентов данных соединений обуславливается за счет генов транспорта эффлюкса в БГК. Уникальной особенностью БГК Альбомидина $\delta 2$ является наличие в нем копии серил-тРНК-синтетазы, устойчивой к SB-217452. При этом филогенетически данная серил - тРНК-синтаза весьма далека от соответствующего гена домашнего хозяйства, присутствующего у стрептомицетов. Поиск NCBI BLAST показывает, что данный ген происходит от представителей редких родов актиномицетов. При этом мотив активного центра хаускипинг серил-тРНК-синтаз штаммов *S. globisporus*, несущих и не имеющих БГК

Альбомицина $\delta 2$ – не различаются, таким образом, отсутствуют признаки адаптационных мутаций хаускипинг серил-тРНК-синтаз к выработке штаммом Альбомицина $\delta 2$.

Внимание авторов, описавших БГК Альбомицина $\delta 2$ также привлекла серил - тРНК - синтазы, находящаяся в кластере и они выдвинули предположение, что наличие такой копии может быть маркером для поиска аналогичных Альбомицину $\delta 2$ ингибиторов тРНК - синтаз и они выявили среди опубликованных в Генбанке геномов штамм, у которого есть гомологичная серил-тРНК-синтаза, а также вокруг неё сосредоточено часть генов, необходимая для синтеза Альбомицина $\delta 2$, однако при этом ряд ключевых генов - отсутствуют. Этот штамм представлен на Рисунке 3.24, он довольно далек от клада *S. globisporus*. Авторы предположили, что этот кластер ответственен за синтез какого то ингибитора тРНК - синтаз, однако экспериментальных подтверждений этому не получено. Можно допустить, что этот кластер является следствием «вставки» кластера Альбомицина $\delta 2$ в геном этого штамма, как это когда то произошло с *S. globisporus*. Мы тоже произвели аналогичный поиски обнаружили, что часть штаммов близкородственного к *S. globisporus* вида *S. anulatus* содержат в геноме также вторую копию гена серил-тРНК-синтазы, однако вокруг неё не удастся обнаружить гены, относящиеся к синтезу Альбомицина $\delta 2$. Возможно в этих БГК синтезируется какой то другой, пока не исследованный ингибитор.

БГК соединения C-1027 описан на примере штамма *S. globisporus* C-1027 и встречается только у представителей этого вида, будучи локализован у них в гигантских линейных плазмидах. Он сравнительно хорошо изучен, т.к. данное соединение проходит испытание для клинического применения [195]. Обращает на себя внимание его распространение то, что плазмиды несущие данный БГК встречаются как у штаммов *S. globisporus* несущих альбомициновый кластер, так и у тех, у кого данный кластер отсутствует, например у ранее изученного нами штамма 4 - 3, вырабатывающего Альбомицин $\delta 2$ таких плазмид нет. При этом у других видов стрептомицетов, геномы которых представлены в Генбанке, по информации на момент исследования, данный БГК отсутствует. Таким образом данные плазмиды имеют строгое сродство именно с видом *S. globisporus*, распространяются среди его представителей, а с другими видами данные плазмиды вероятно несовместимы.

Таким образом, на примере штамма *S. globisporus* bja209 была продемонстрирована эффективность использования низкомолекулярных индукторов (ионов металлов) для регуляций экспрессией БГК. Ключевым элементом, обеспечивающим переключение между синтезом Альбомицина $\delta 2$ и Дефероксамина Е, является транскрипционный фактор DmdR1, активность которого опосредована концентрацией ионов железа в среде. Однако данный подход имеет ограничения, поскольку не для всех «молчащих» БГК существуют известные природные

индукторы, а подбор условий культивирования часто требует длительных эмпирических поисков.

Альтернативной стратегией является прямое вмешательство в регуляторные сети путём сайт-направленного мутагенеза, позволяющее инактивировать гены-репрессоры или усиливать активность промоторов. Для апробации такого подхода был выбран штамм *Amycolatopsis comptoni* A23^T, продуцирующий ценный антибиотик Тетраценомицин Х. Результаты направленного редактирования гена-регулятора *afsR* с использованием системы CRISPR-Cas9 представлены в следующей главе.

3.2. Проведение сайт-направленного мутагенеза в клетках *Amocolatopsis comptoni* A23^T посредством CRISPR-Cas9 системы

Использование генно-инженерных подходов, а именно технологии редактирования генома, позволяют активировать экспрессию генов в БГК. Для манипуляций с геномом необходимо введение генетической конструкции в клетки посредством трансформации. Выбор методов и непосредственно процесс трансформации актиномицетов является наиболее важным и одновременно сложным этапом работы.

3.2.1. Получение генетической конструкции pAcTransTest, предназначенной для оценки эффективности трансформации клеток актиномицетов

Низкая трансформационная способность штаммов актиномицетов связана с морфо-физиологическими особенностями строения клетки. Клетки большинства актиномицетов собраны в цепочки – мицелий. Каждый сегмент цепи имеет типичную для грамположительных бактерий структуру клеточной оболочки, представленную тонкой плазматической мембраной, которая покрыта толстым пептидогликановым слоем порядка 35 нм толщиной [196]. Такое строение клеток вносит свои ограничения и снижает трансформационную способность. Типичные методы трансформации, разработанные для модельных организмов, таких как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и пр. оказываются в большинстве случаев безрезультатными или не могут быть реализованы на клетках актиномицетов.

Этап трансформации является ключевым в генно-инженерной работе и подбор оптимального метода для конкретного штамма актиномицетов определяет успех всего эксперимента. Чтобы оценить эффективность каждого доступного метода трансформации была создана генетическая конструкция на основе генов двух флуоресцентных белков TurboRFP и Katushka2S. В том случае, если клетки приобрели лазмиду в ходе трансформации, то колонии будут вырабатывать флуоресцентный белок, тем самым визуально подтверждая успешность трансформации и экспрессии генов под целевым промотером и позволяя выбрать оптимальный для данного штамма метод.

Генетическая конструкция для оценки эффективности трансформации pAcTransTest была создана на основе плазмиды pCRISPOmyces-2 [197], исходно предназначенной для проведения сайт-направленного мутагенеза. Данная плазида представляет собой шаттл-вектор, способный реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в клетках актиномицетов благодаря ColE1 и pSG5

ориджинам репликации, соответственно. Кроме того, генетическая конструкция содержит ген белка Cas9 и последовательность gRNA, находящиеся под конститутивными промоторами *rpsL* и *gapdh*, что отражено на Рисунке 3.16.

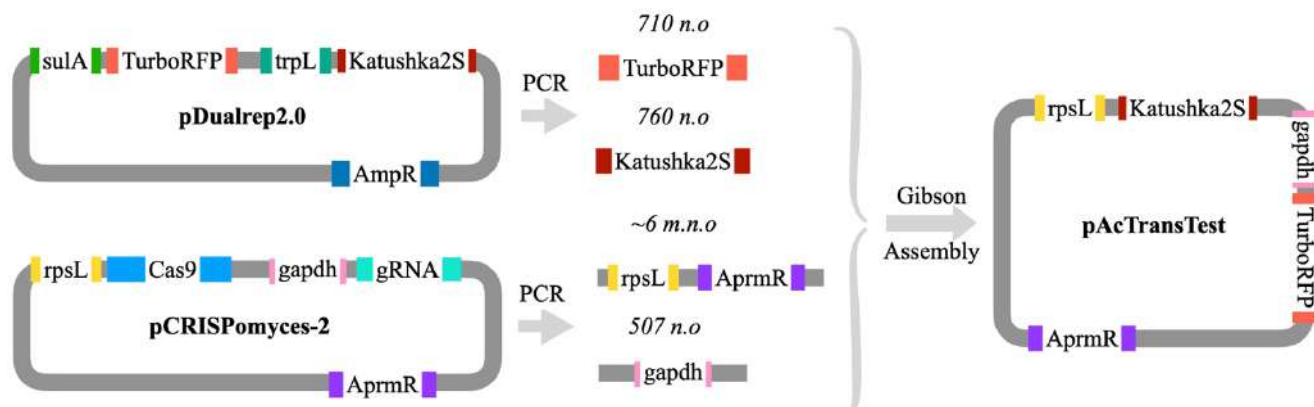


Рисунок 3.16 – Схема получения целевой генетической конструкции pAcTransTest на основе плазмиды pCRISPOmyces-2

Для получения целевой конструкции pAcTransTest, предназначенной для выявления эффективности различных методов трансформации, гены *cas9* и *grna* были заменены на гены двух флуоресцентных белков Katushka2S и TurboRFP. Последовательности данных генов были амплифицированы с плазмиды pDualrep2.0 [137], используя олигонуклеотидные праймеры, представленные в Таблице 2.5 подраздела 2.3.1. Поскольку плазида pCRISPOmyces-2 содержит ген белка Cas9 и ген *grna*, следовательно только с гена *cas9* будет происходить трансляция, а с гена *grna* будет происходить только транскрипция. Поэтому для промотора *gapdh* была добавлена соответствующая последовательность Шапиро-Козарского на 5'НТО (нетранслируемая область) для дальнейшего биосинтеза флуоресцентного белка TurboRFP. Первоначально авторами промотор *gapdh* был взят из *Eggerthella lenta*, поэтому 5'НТО был также взят из данной бактерии [197]. Результат амплификации генов флуоресцентных белков и плазмидного вектора приведен на Рисунке 3.17.

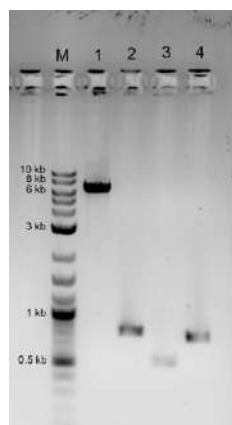


Рисунок 3.17 – Электрофореграмма амплифицированных фрагментов для сборки конструкции: 1) *gpsL* (~6 т.п.о.); 2) *Katushka2S* (~760 п.о.); 3) *gapdh* (~500 п.о.); 4) *TurboRFP* (~700 п.о.); М) Маркер молекулярного веса 1kb plus

Получение конструкции осуществлялось с помощью сборки по Гибсону, согласно подразделу 2.3.5., используя фирменный набор HiFi assembly. В ходе клонирования ген белка *Katushka2S* был клонирован под промотор *gpsL*, а ген белка *TurboRFP* вместе с 5'НТО (TGGAGG) для гена *gapdh* из *E. lenta* под соответствующий промотор *gapdh*. Трансформированные клоны использовались для амплификации с дополнительных олигонуклеотидных праймеров, представленных в Таблице 2.5 подраздела 2.3.1., для подтверждения соответствующих вставок в плазмиде *pAcTransTest*. Результат амплификации генов флуоресцентных белков на основе трансформированных клонов, отражен на Рисунке 3.18.

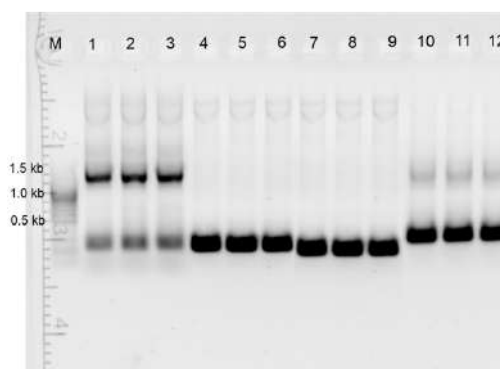


Рисунок 3.18 – Электрофореграмма амплифицированных фрагментов с проверочных праймеров: 1-3) Праймеры *chk1* (~250 п.о.); 4-6) Праймеры *chk2* (~250 п.о.); 7-9) Праймеры *chk3* (~200 п.о.); 10-12) Праймеры *chk4* (~250 п.о.); М) Маркер молекулярного веса 100 bp plus

Генетическая конструкция *pAcTransTest* была наработана в клетках *E. coli* Ec135, геном штамма приведен в Таблице 2.1 подраздела 2.1.2., и использована для экспериментов по подбору оптимальных условий трансформации актиномицетов. Данный штамм был использован ввиду

того, что в клетках как *E.coli*, так и актиномицетов существуют естественные механизмы защиты от чужеродной ДНК, представленные в частности системой рестрикции и модификации. Несоответствие паттернов метилирования между филогенетически-далекими бактериями приводит к активации ферментов эндонуклеаз рестрикции в трансформированном штамме и последующем расщеплении, полученной генетической конструкции. Данные различия обуславливают сложности в манипуляции с генетическими конструкциями.

В качестве объекта для проведения экспериментов по трансформации был использован ранее описанный нашей группой штамм, представитель нового вида *A. camponoti* sp. A23^T [198]. Геном штамма A23^T приведен в Таблице 2.2 подраздела 2.1.2.

В качестве методов трансформации штамма *A. camponoti* sp. A23^T были выбраны электропорация [140, 199] и конъюгация [200]. При этом для каждого метода трансформации необходимы клетки различной фазы роста и структуры клеток. Так например, процесс электропорации осуществлялся на мицелиальных клетках, конъюгация производилась на суспензии спор.

Основной задачей, используя метод электропорации, является деионизация клеточной суспензии актиномицетов. Электропорация проводилась на мицелиальной культуре возрастом 5-7 суток, что для штамма *A. camponoti* sp. A23^T соответствует экспоненциальной фазе роста, выращенной в жидкой питательной среде MG-1, состав которой представлен в подразделе 2.1.1. Подготовка компетентных вегетативных клеток осуществлялась согласно подразделу 2.2.9. Результаты трансформации штамма A23^T представлены на Рисунке 3.19.

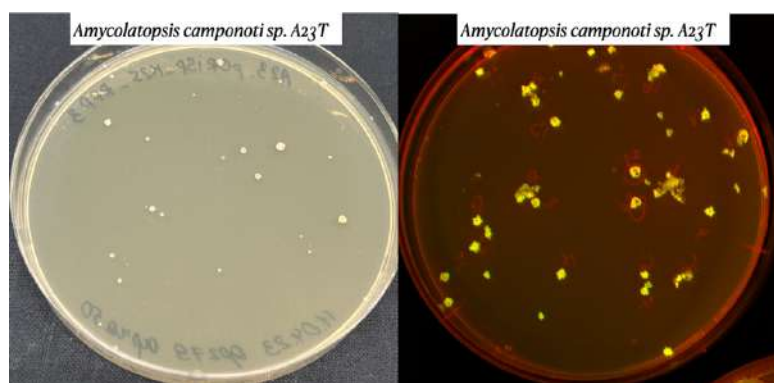


Рисунок 3.19 – Трансформированные плазмидой pAcTransTest мицелиальные клетки на среде Органический агар 79 с добавлением селективного маркера апрамицина в концентрации 50 мкг/мл. Слева чашка при естественном освещении; справа чашка в системе геля документации ChemiDoc при свечении в диапазоне 550-650 нм

Далее позитивные клоны были рассеяны по секторам на агаризованную среду Органический агар 79, состав которой приведен в подразделе 2.1.1., с 50 мкг/мл апрамицина. Из

трансформированных клонов были амплифицированы гены *katushka2S* и *turborfp* для подтверждения результатов. Результаты амплификации и роста трансформированных клонов штамма A23^T по секторам на среде Органический агар 79 представлены на Рисунке 3.20.

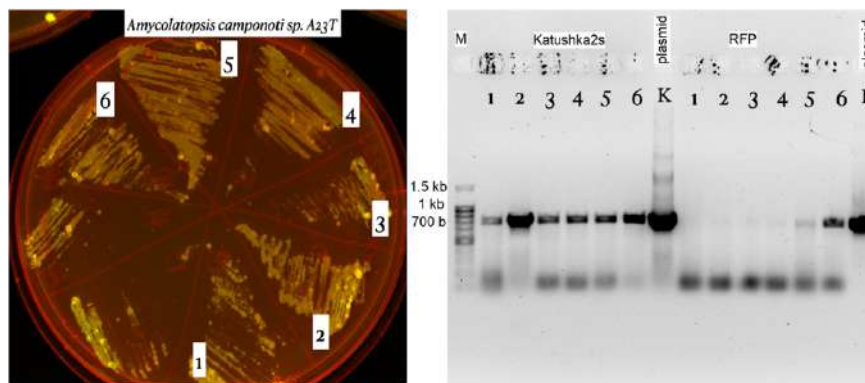


Рисунок 3.20 – Слева трансформированные плазмидой pAcTransTest мицелиальные клетки в системе гельдокументации ChemiDoc при свечении в канале Cy5 или Cy3. Справа электрофореграмма амплифицированных фрагментов генов *katushka2S* и *turborfp*. Номера секторов на чашке соответствуют номерам лунок на геле. М) Маркер молекулярного веса 100 bp plus. К) Положительный контроль плазмиды pAcTransTest

Следующим подходом для переноса генетической информации в клетки *A. camponoti* A23^T выступал метод конъюгации с использованием специализированного штамма *E. coli* pUZ8002/ET12576, геном которого приведен в Таблице 2.1 подраздела 2.1.2., характеризующийся наличием вспомогательной плазмиды pUZ8002, способствующей формированию конъюгативного аппарата и переносу целевой конструкции pAcTransTest из донорной бактериальной клетки в клетки актиномицетов. Кроме того, штамм *E. coli* pUZ8002/ET12576 имеет делецию генов метилаз *dam* и *dcm*, что позволяет устранить конфликт в системе рестрикции-модификации у филогенетически-далеких видов бактерий.

Для проведения актов конъюгаций штамм *E. coli* pUZ8002/ET12576 был затрансформирован плазмидным вектором pAcTransTest. В ходе работы было проведено 10 серий экспериментов, однако ни в одном случае не было получено позитивных результатов. В качестве методик были использованы [200, 201] с модификациями. Согласно выранным методикам для проведения конъюгативного переноса плазмидных векторов необходимо использовать донорные клетки *E. coli* pUZ8002/ET12576, содержащие плазмидный вектор pAcTransTest в средней экспоненциальной фазе роста, а клетки актиномицетов в состоянии суспензии спор.

Основным этапом в переносе плазмидного вектора между донорной и реципиентной клеткой является формирование контакта [202]. Поэтому более эффективно образовать

конъюгативную пару между *E. coli* и спорами актиномицетов, а не мицелиально ветвящимися гифами актиномицетов.

Количество спор определяли с помощью серии разведения споровой суспензии в фосфатном буфере от 10^{-2} до 10^{-5} и исходя из количества проросших колоний на плотной агаризованной среде использовали оптимальное количество для конъюгации. Результаты представлены на Рисунке 3.21.

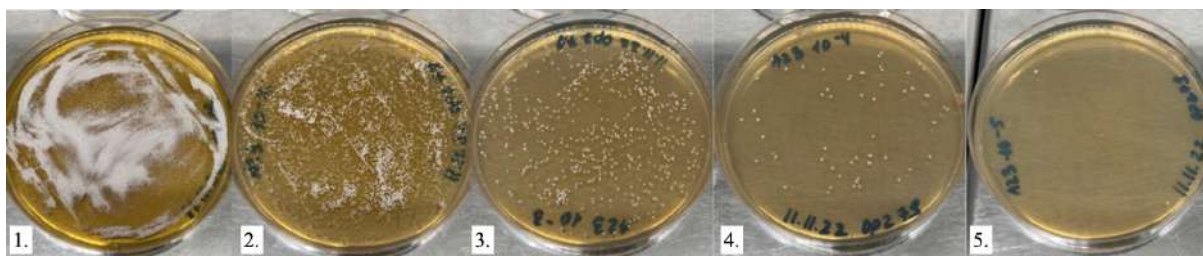


Рисунок 3.21 – Серия разведений моноспоровой суспензии штамма *A. camponoti* sp. A23^T на плотной агаризованной среде: 1) Исходная моноспоровая суспензия, 2-5) Серия разведений от 10^{-2} до 10^{-5}

Подготовленные клетки *E. coli* pUZ8002/ET12576 средней экспоненциальной фазы (ОП₆₀₀ = 0,55-0,7) и моноспоровая суспензия *A. camponoti* A23^T в количестве 10^8 - 10^9 спор в 2х УТ буфере, состав которой приведен в подразделе 2.1.1., смешивались в разном соотношении донор/споры ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$). При этом согласно методике [200] споры актиномицетов дополнительно подвергаются тепловому шоку при температуре 50°C в течение 10 минут и затем смешиваются с клетками *E. coli* pUZ8002/ET12576. Полученную суспензию наносят на агаризованную среду R2 по каплям объемом 5-10 мкл. По истечении 16-18 часов наносят на поверхность чашки раствор антибиотиков - налидиксовая кислота в концентрации 300 мкг/мл и селективный маркер апрамицин в концентрации 50 мкг/мл.

Однако культивация конъюгантов в течение 21 дня на плотной среде с добавлением селективного макрера, проросших колоний актиномицетов не наблюдалось. Поэтому для следующего раза в процессе подготовки спор актиномицетов этап с тепловой обработкой пропускали и полностью следовали методике [201, 202]. В ходе конъюгации согласно этому протоколу, после инкубации 16-18 часов поверхность агаризованной среды не была излишне контаминирована клетками *E. coli* pUZ8002/ET12576. На Рисунке 3.22 представлены результаты спустя 5-7 дней инкубации суспензии донор/споры на селективной среде и добавлением налидиксовой кислоты были получены колонии клеток по морфологическим признакам похожие на актиномицеты.

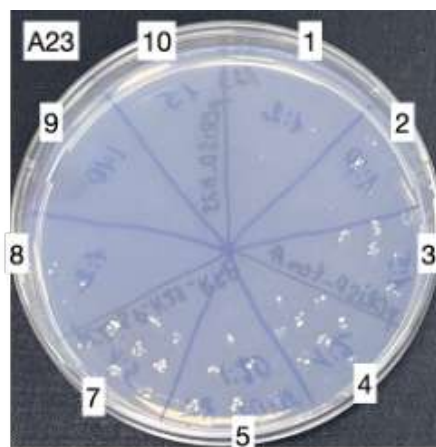


Рисунок 3.22 – Капли суспензии клеток *E. coli* pUZ8002/ET12576 и спор *A. camponoti* A23^T на плотной агаризованной среде R2 в соотношении: 1-3) $\frac{1}{2}$; 4-7) $\frac{1}{5}$; 8-10) $\frac{1}{10}$. На поверхности агара раствор антибиотиков – налидиксовая кислота в концентрации 300 мкг/мл и селективный маркер апрамицин в концентрации 50 мкг/мл

Однако последующая культивация конъюгантов на селективной среде с добавлением апрамицина в концентрации 50 мкг/мл в течение 21 дня не дала позитивных результатов.

На основании полученных результатов в качестве основного метода трансформации для *A. camponoti* A23^T выбран метод электропорации. Это решение обосновано:

- Воспроизводимым получением трансформантов;
- Визуальным подтверждением экспрессии репортерных генов;
- Возможностью масштабирования для получения большего числа клонов.

Разработанная конструкция рAcTransTest доказала свою эффективность как инструмент для скрининга методов трансформации. В отличие от селекции по антибиотикоустойчивости, флуоресцентный репортер позволяет:

1. Визуально оценивать эффективность трансформации в реальном времени;
2. Исключать ложноположительные колонии (устойчивость без трансформации);
3. Оптимизировать условия, варьируя параметры и количественно оценивая результат по интенсивности флуоресценции.

Полученные результаты будут использованы для дальнейших работ по сайт-направленному мутагенезу с использованием специализированных генетических конструкций на основе рCRISPopomyses-2. Успешная трансформация электропорацией открывает возможность для редактирования генома *A. camponoti* A23^T, включая инактивацию гена-репрессора *afsR* для увеличения продукции Тетраценомицина X.

3.2.2 Сайт-направленный мутагенез с помощью CRISPR-Cas9 системы

Технология на основе кластерной регулярно взаимосвязанной системы коротких палиндромных повторов CRISPR/Cas, особенно системы CRISPR/Cas9, является очень перспективным инструментом для генной инженерии штаммов актиномицетов. На основе системы CRISPR/Cas9 были разработаны две версии плазмид для манипуляций с геномом стрептомицетов: pCRISPOmyces-1 и pCRISPOmyces-2. Данные генетические конструкции отличаются последовательностью направляющих РНК. В случае pCRISPOmyces-1 последовательности генов CRISPR RNA (crRNA) и транскрипционно-активирующей CRISPR RNA (tracrRNA) транскрибируются в отдельные РНК и затем вместе с белком Cas9 формируют активный комплекс [8].

Генетическая конструкция pCRISPOmyces-2 содержит химерную последовательность гена single guide RNA (gRNA), в которой содержится специфическая последовательность к целевому участку генома, а также «скаффолд» для связывания с белком Cas9 [201, 203]. Такая конструкция обеспечивает большую эффективность и стабильность в клетке [203]. Поэтому в работе была использована система на основе pCRISPOmyces-2. Кроме того, данная конструкция содержит кодон оптимизированную последовательность для гена *cas9* для лучшей экспрессии в *Streptomyces*. Плазмидный вектор на основе pCRISPOmyces-2 с последовательностью *grna*, нацеленного на гена *afsR* – репрессора синтеза тетраценомицина X, была использована на штамме *A. comptoni* A23^T для получения штамма с большей способностью синтезировать Тетраценомицин X. Схема внесения мутаций в БГК Тетраценомицина X отражена на Рисунке 3.23.

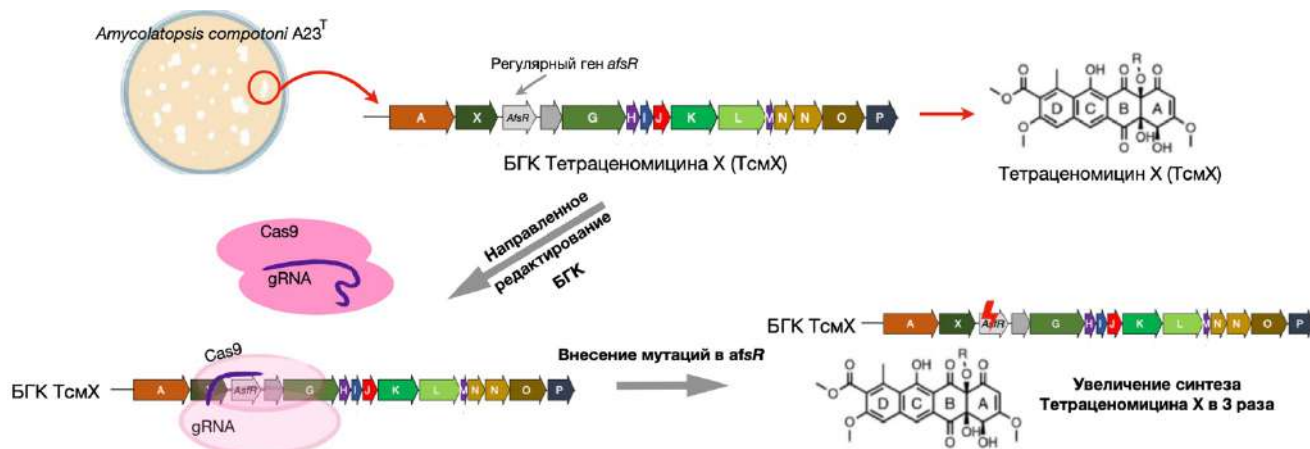


Рисунок 3.23 – Схема сайт-направленного мутагенеза посредством CRISPR-Cas9 системы на штамме *A. comptoni* A23^T

Выбор *A. comptoni* A23^T в качестве объекта для проведения сайт-направленного мутагенеза был обусловлен рядом факторов: наличие аннотированного генома для выбора мишени и последующей модификации gRNA в генетической конструкции, трансформируемость штамма, а также способностью штамма синтезировать ценный метаболит, увеличение продукции которого является критически важным для экспериментов с получением и анализом полусинтетических производных. *A. comptoni* A23^T – продуцент Тетраценомицина X (ТсмХ), ранее выделенный в нашей лаборатории [204] оптимально соответствует данным критериям. Мишенью для связывания gRNA была выбрана последовательность гена репрессора AfsR, т.к. согласно литературным, данный белок обладает способностью ингибировать сверхэкспрессию ТсмХ актиномицетом, а следовательно инактивация данного гена потенциально способна привести к увеличению продуктивности штамма.

Внесение генетической конструкции в клетки *A. comptoni* A23^T осуществлялось с помощью вышеописанного метода электропорации, полученные трансформанты высевали на плотную питательную среду Органический агар 79, состав которой приведен в подразделе 2.1.1. с добавлением селектирующего маркера апрамицина в концентрации 50 мкг/мл.

Далее исходный и мутированный штаммы параллельно культивировали использовали для проверки антагонистической активности в отношении репортёрного штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC. Результаты антагонистической активности приведены на Рисунке 3.24.

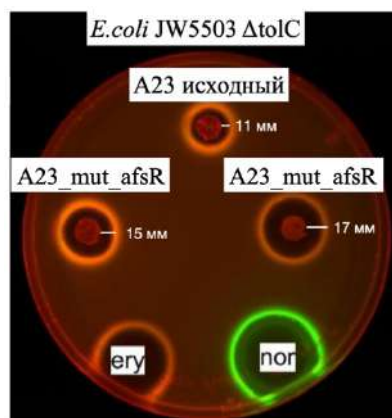


Рисунок 3.24 – Скрининг антимикробного действия исходного штамма *A. comptoni* A23^T и мутированных клонов *A. comptoni* A23^T_mut_afsR в отношении репортёрного штамма *E. coli* JW5503 Δ tolC. Размеры зон лизиса оценивались с помощью Antibiotic ZoneScale – C (HIMEDIA)

Результаты скрининга показывают, что площадь зоны ингибирования, обусловленная полученными мутантами *A. comptoni* A23^T_mut_afsR примерно в 2 раза больше в сравнении с исходным штаммом *A. comptoni* A23^T. Для количественной оценки увеличения доли

синтезируемого метаболита – Тетраценомицина X, полученные КЖ подвергались твердофазной экстракции с последующим фракционированием посредством ВЭЖХ. А для подтверждения антагонистического действия конкретно Тетраценомицином X, активные фракции анализировали с помощью ХМСА, что отражено на Рисунке 3.25.

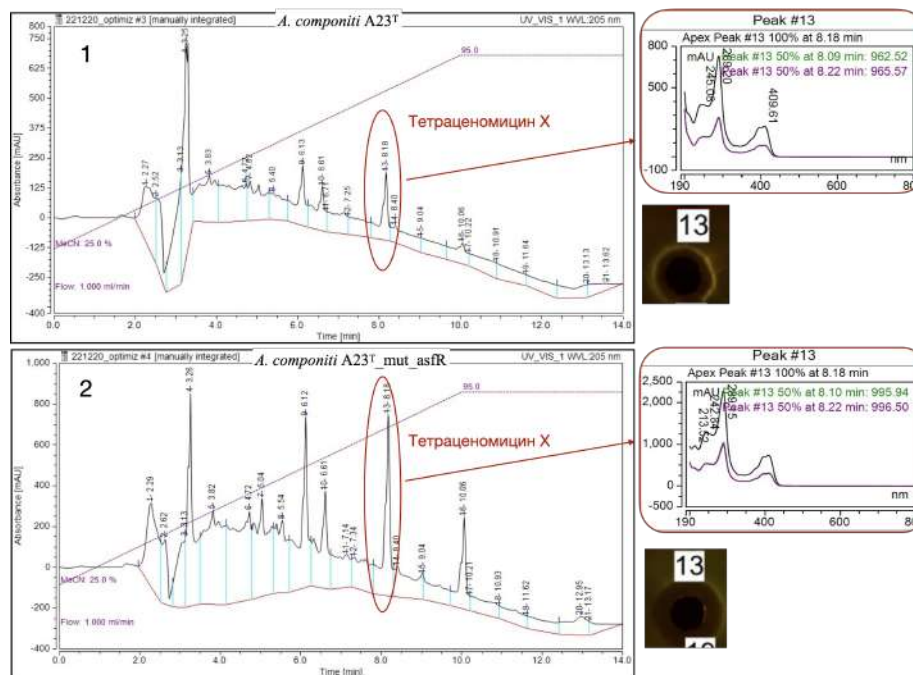


Рисунок 3.25 – Хроматограммы, полученные в результате фракционирования посредством ВЭЖХ из КЖ 1) Исходного штамма *A. comptoni* A23^T; 2) Мутированного штамма *A. comptoni* A23^T_mut_afsR. Для каждого образца представлены данные УФ поглощения 400 нм, что соответствует поглощению молекулы Тетраценомицина X

В ходе ВЭЖХ очистки было выявлено, что фракция соответствующая Тетраценомицину X (подтверждено масс-спектрометрическим анализом), полученная из мутантного штамма *A. comptoni* A23^T_mut_afsR имеет в 3 раза больше интенсивность поглощения, чем фракция из исходного штамма *A. comptoni* A23^T. Тем самым делеция мутация в гене *afsR* привела к увеличению продукции тетраценомицина X в 3 раза культивации штаммов в одних и тех же условиях и объеме питательной среды.

Вероятно, большая продукция Тетраценомицина X может ограничиваться возможностями самого *A. comptoni* A23^T, поскольку избыток антибиотика в клетках может приводить к их гибели, несмотря на наличие генов устойчивости, ассоциированных с кластером Тетраценомицина X.

Полученные в работе результаты подтверждают, что технология CRISPR-Cas9 на основе платформы pCRISPOmyces-2 является эффективным инструментом для геной инженерии

актиномицетов [205]. Выбор гена *afsR* в качестве мишени был обусловлен его принадлежностью к семейству SARP-подобных (Streptomyces antibiotic regulatory proteins) транскрипционных факторов, которые часто выполняют функции регуляторов биосинтеза вторичных метаболитов у актиномицетов. Литературные данные показывают, что представители семейства SARP широко распространены в биосинтетических кластерах стрептомицетов и могут влиять на экспрессию соответствующих генов [206, 207]. Инактивация таких транскрипционных факторов является стратегией для изменения биосинтетических путей и активации «молчащих» кластеров.

Проведённое исследование согласуется с литературными данными по использованию инактивации регуляторов для повышения биосинтетического потенциала штаммов актиномицетов. Важно подчеркнуть, что регуляторные белки семейства SARP традиционно рассматриваются как активаторы транскрипции генов биосинтеза антибиотиков [208]. Однако существуют ряд научных исследований, в которых SARP-регуляторы проявляют нетипичную функцию. Таким примером может выступать ген *atr32*, кодирующий SARP-белок из БГК Атратумина в штамме *S. atratus* SCSIO ZH16NS-80S [209]. Исследователями было выявлено, что нокаут гена *atr32* приводит к повышению биосинтеза Атратумина в 2,3 раза [209]. Авторы заключили, что Atr32 функционирует как репрессор, что принципиально отличается от классической роли SARP-регулятора.

Схожие данные были получены и для другого представителя SARP-регуляторов – Sare4854 из *Salinispora arenicola* DSM44819. При гетерологической экспрессии гена *sare4854* в штамме *Streptomyces sp.* AM-7161 (продуцент Медермицина) наблюдалось снижение биосинтеза данного антибиотика [210]. В ходе биоинформатического анализа исследователи выявили в Sare 4854 дополнительный NTPase-домен на С-концевом участке белковой молекулы. Было высказано предположение, что этот дополнительный домен может модулировать активность белка, превращая его из активатора в репрессор [210].

Таким образом, проведенное диссертационное исследование демонстрирует, что сайт-направленный мутагенез с использованием системы CRISPR-Cas9 на основе pCRISPOmyces-2 является эффективной стратегией для повышения биосинтетического потенциала актиномицетов. Инактивация гена-репрессора *afsR* привела к трехкратному увеличению продукции тетраценомицина X у *A. camponoti* A23^T. Полученный мутантный штамм представляет собой ценный объект для дальнейших исследований физиологических пределов гиперпродукции антибиотиков у актиномицетов.

Однако для понимания эволюционных закономерностей формирования резистентности у актиномицетов не менее важно изучать и те штаммы, которые сами не являются продуцентами антибиотиков, но при этом обладают множественной лекарственной устойчивостью. Такие микроорганизмы представляют собой природный резервуар генов резистентности, эволюция

которых может протекать независимо от биосинтеза антимикробных соединений. В качестве модели для такого исследования был выбран штамм *K. flava* YrIIa5, демонстрирующий устойчивость к β -лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам и другим классам антибиотиков при полном отсутствии антагонистической активности.

3.3. Геномный и функциональный анализ представителя *Krasilnikoviella flava* YrIIa5 с множественной лекарственной устойчивостью

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 [21, 159].

3.3.1. Таксономическая идентификация и общая характеристика генома штамма *Krasilnikoviella flava* YrIIa5

Полногеномное секвенирование (Illumina HiSeq 4000) и сборка (SPAdes v3.13.0) показали, что геном штамма YrIIa5 представлен линейной хромосомой размером 3,879,069 п.о. с содержанием GC пар 73,87%, соответствующее представителями семейства *Promicromonosporaceae* [211], что отражено на Рисунке 3.26.

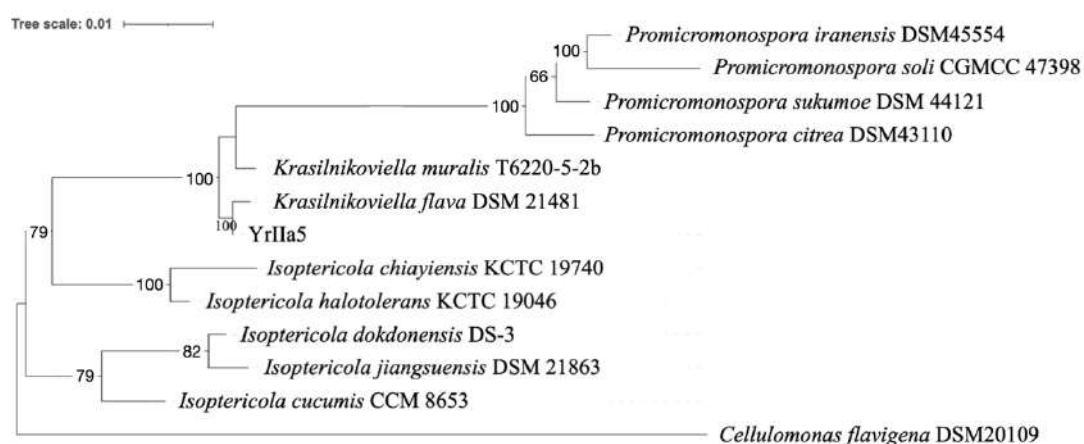


Рисунок 3.26 – Филогенетическое дерево рассчитанно по 16S rRNA последовательностям штамма YrIIa5 и близких видов с помощью IQ-TREE v3.1.3 [212]. Длина ветвей определена в терминах эволюционного расстояния TIM2+F+R3. Числа в узлах – это значения поддержки псевдозагрузки > 60% для 1000 повторов с дополнительной оптимизацией NNI. Дерево укоренено с использованием *Cellulomonas flavigena* DSM20109 в качестве внешней группы

Филогенетический анализ как на основе 16S рРНК, так и полногеномной последовательности, в сопоставлении с последовательностями типовых штаммов видов, размещенных в базе данных TYGS и ГенБанк, показал, что штамм YrIIa5 входит в общий кластер с *Isoptericola cucumis* CCM 8653 и *Isoptericola hypogeus* 15589, а внутри этого кластера формирует монофилетическую кладу с типовым штаммом *K. flava* DSM 21481^T с уровнем поддержки 99%.

Средняя идентичность нуклеотидов (ANI), рассчитанная при помощи алгоритма OrthoANI, и *in silico* ДНК-ДНК гибридизация между YrIIa5 и типовым штаммом *K. flava* DSM 21481^T составили 98,16% и 75% соответственно. Сравнительная характеристика генома штамма YrIIa5 и его филогенетически близкими соседями отражена в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Сравнительный анализ генома YrIIa5 и близкородственных штаммов [159]

	Размер генома, млн.п.н.	G+C, %	dDDH, %	ANI, %
YrIIa5	3.8	73.87	---	---
<i>Krasilnikoviella flava</i> DSM 21481	4.8	73.74	75.0	98.16
<i>Isoptericola cucumis</i> CCM 8653	4.4	74.05	34.7	81.10
<i>Isoptericola halotolerans</i> KCTC 19046	3.9	72.58	20.5	76.62
<i>Isoptericola chiayiensis</i> KCTC 19740	3.6	73.04	21.2	76.87
<i>Isoptericola docdonensis</i> DS-3	3.8	73.81	23.4	77.39
<i>Isoptericola jiangsuensis</i> DSM 21863	4.0	73.83	22.5	76.20
<i>Promicromonospora soli</i> CGMCC 47398	5.4	71.07	16.6	75.32
<i>Promicromonospora iranensis</i> DSM 45554	5.8	71.35	16.4	75.31
<i>Promicromonospora sukumoe</i> DSM 44121	6.5	72.46	17.3	76.09

Поскольку рассчитанные величины оказались выше, чем принятые значения 95-96% и 70%, использующиеся для разграничения видов [213, 214], мы полагаем, что штамм YrIIa5 следует отнести к виду *Krasilnikoviella flava*.

Впервые штамм *Krasilnikoviella flava* был выделен из образца донных отложений Балтийского моря на побережье Германии и описан в 2009 году как представитель рода *Promicromonospora* [213]. Позднее из фрески в древней гробнице Такамацузука (Япония, префектура Нара) был выделен штамм актинобактерии, по совокупности филогенетических и хемотаксономических признаков тесно связанный с ранее описанным *Promicromonospora flava*. С помощью анализа последовательностей 16S рРНК авторы определили, что оба штамма формируют отдельную филогенетическую ветвь внутри клады *Promicromonospora* с высокой поддержкой кластеризации и также имеют ряд фенотипических отличий от ранее описанных видов данного рода. В 2017 году Nishijima с соавторами описали новый род *Krasilnikoviella* внутри семейства *Promicromonosporaceae*, в котором в качестве типового вида был предложен

описанный ими *Krasilnikoviella muralis*, а для *Promicromonospora flava* была осуществлена реклассификация в *Krasilnikoviella flava* [214, 215].

3.3.2. Фенотипические и микроморфологические признаки штамма

Krasilnikoviella flava YrIIa5

Штамм YrIIa5 хорошо растет в аэробных условиях на средах IPS2 и IPS3, что продемонстрировано на Рисунке 3.27, а также LB, Органическом агаре 79, формируя компактные гладкие колонии от белого до светло-желтого цвета [159].

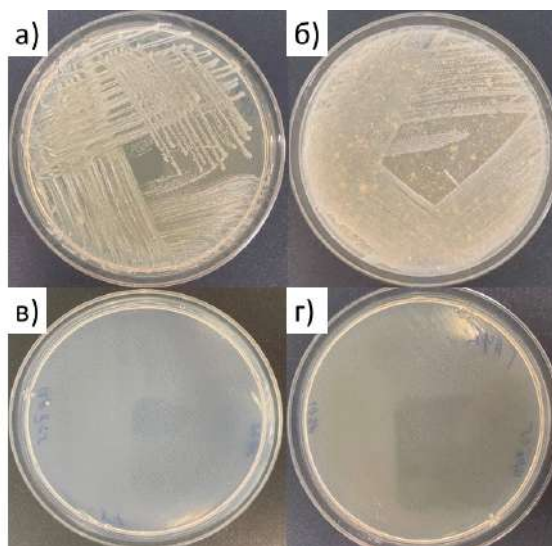


Рисунок 3.27 – Рост штамма *Krasilnikoviella flava* YrIIa5 на разных средах а) IPS2; б) IPS3; в) LB; г) Органический агар 79 [159]

На поверхности плотной среды формирует округлые гладкие клетки светло-желтого цвета. Для представителей данного вида характерна модель роста «кокк-палочка-кокк», согласно которой штамм претерпевает ряд морфологических изменений – спустя время округлые клетки превращается в изогнутые, ветвящиеся палочки с последующим возвращением в изначальную округлую форму. Морфологические изменения штамма YrIIa5 с течением времени показаны на Рисунке 3.28.

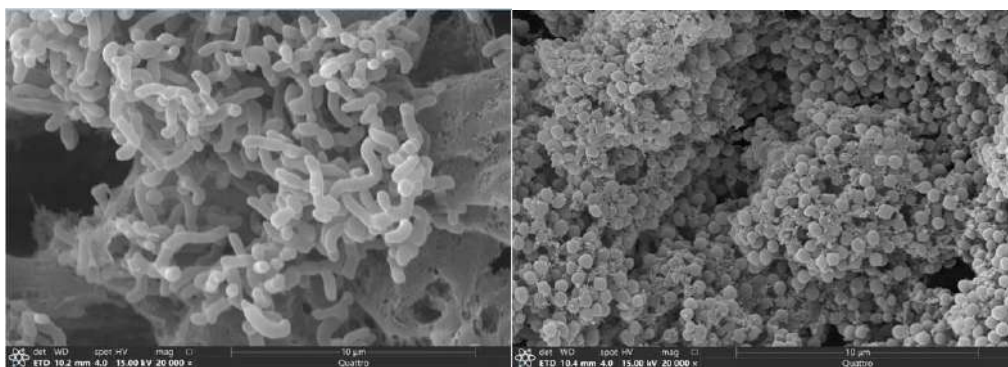


Рисунок 3.28 – Микрофотографии штамма *K. flava* YrIIa5, полученные с помощью электронного микроскопа, культивация на среде Органический агар 79 при 28°C, в течение 2 суток (слева) и 6 суток (справа) [159]

Микроскопирование показало, что клетки имеют грамположительный тип окрашивания, неподвижны и имеют диаметр клеток 0,56 до 0,65 мкм [159].

В результате тестирования штамма на способность ферментировать источники углерода с помощью диско-диффузионного метода, было установлено, что штамм в основном использует моносахариды: глюкозу, галактозу, маннозу, рамнозу, фруктозу, и дисахарид целлобиозу [159]. Подробные данные приведены в Таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Культуральные характеристики штамма *Krasilnikoviella flava* YrIIa5 и филогенетически близких видов

	YrIIa5	<i>K. flava</i> DSM 21481	<i>I. cucumis</i> CCM8653
Образование кислоты из моносахаридов и спиртов			
Адонит	-	-	-
Арабиноза	-	-	+
Галактоза	+	-	-
D-Глюкоза	+	+	+
Дульцит	-	-	-
Инозит	-	-	-
Ксилоза	+	+	-
Маннит	-	-	-
Манноза	+	-	+
Рамноза	+	-	+
Салицин	-	-	-
Сорбит	-	-	-
Фруктоза	+	-	+
Образование кислоты из дисахаридов			
Лактоза	-	-	-
Мальтоза	--	--	--
Мелибиоза	--	--	--
Образование кислоты из дисахаридов			
Сахароза	--	--	+
Трегалоза	--	--	--
Целлобиоза	+	--	+

Продолжение Таблицы 3.7

	YrIIa5	<i>K. flava</i> DSM 21481	<i>I. cucumis</i> CCM8653
Образование кислоты из полисахаридов			
Инулин	--	--	--
Раффиноза	--	--	+
Гидролитическая активность			
Карбоксиметилцеллюлоза	--	н.о.	+
Желатин	--	--	н.о.
Крахмал	--	+	н.о.
ДНК	--	+	н.о.
Твин 80	--	+	н.о.
Хелатирование железа	--	н.о.	н.о.

«--» - не наблюдается утилизации источника углевода; «н.о.» - не обнаружено данных.

Штамм YrIIa5 показал способность к образованию кислот из большего количества моно- и олигосахаридов по сравнению с типовым штаммом, однако, уступил ему в способности к гидролизу более сложных полимеров – крахмала, ДНК, Твина80.

Скрининг на антимикробную активность в отношении ряда штаммов *E. coli* BW25113 lptD, *E. coli* JW5503 ΔtolC, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* SS01, *Staphylococcus aureus* (MRSA) INA00761, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* CBS 8836, *Mycobacterium smegmatis* Ac-1171 дал отрицательные результаты, что согласуется с отрицательными результатами поиска в геноме биосинтетических кластеров, ответственных за продукцию антимикробных метаболитов [159].

Вследствии скудного роста штамма на среде ISP9 был проведен эксперимент, в котором исследовалась вероятная потребность штамма в ростовых факторах, в результате удалось определить, что добавление в минеральную среду, содержащую 2% глюкозы, 0,1% дрожжевого экстракта способствует активному росту и накоплению биомассы. Кроме того исследование штамма на способность расти в условиях повышенной солености показало, что оптимальная концентрация NaCl для обильного роста составляет 0,5-1%, повышение концентрации свыше 1% характеризуется замедлением или полным отсутствием роста микроорганизма в созданных условиях [159]. Штамм YrIIa5 является мезофилом с оптимумом роста при 28-30°C и нейтрофилом с pH-оптимумом 7.0 в то время как границы толерантности охватывают от 5 до 8 pH [159].

Несмотря на фенотипическое сходство YrIIa5 и типовым штаммом существуют явные физиологические отличия, которые свидетельствуют об индивидуальных адаптациях актиномицетов к условиям своих местообитаний. Так, типовой *Krasilnikovella flava* DSM 21481^T, выделенный из донных осадков Балтийского моря [213], средняя соленость поверхностных вод

которого составляет около 8%, способен расти в диапазоне 1-15% (мас./об.) NaCl, в то время как штамм YrIIa5, выделенный из почв с низкой минерализацией, способен расти при концентрации NaCl не более 1 %. Штамм YrIIa5 растет в диапазоне pH 5.0–8.0 с оптимумом при pH 7.0, в то время как pH-диапазон роста типового штамма *K.flava* DSM 21481^T захватывает более щелочную область до pH 10.5. Вероятно, это также проявление индивидуальной адаптации штаммов к условиям окружающей среды: воды Балтийского моря характеризуются слабощелочным pH 8.33 - 8.35 [214], в то время как pH водной вытяжки почвы, откуда был выделен штамм YrIIa5, составил 6.0.

3.1.3. Фенотипический профиль антибиотикорезистентности и идентификация генов множественной лекарственной устойчивости штамма *Krasilnikoviella flava* YrIIa5

В ходе скрининга штамма YrIIa5 на чувствительность к антибиотикам была выявлена множественная лекарственная устойчивость YrIIa5 к исследуемым антибактериальным агентам, за исключением Ванкомицина (диаметр зоны 45 мм), Кларитромицина (диаметр зоны 50 мм), Стрептомицина и Тетрациклина (диаметр зон 20 мм), Тетраценомицина Х (диаметр зоны 18 мм) и с более слабым воздействием Ампициллина, Линкомицина и Рифампицина (диаметр зон с 10 мм) [159]. Подробные данные отражены в Таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Определение чувствительности штамма YrIIa5 к антибактериальным препаратам

Антибиотик, мкг	Зона ингибирования, мм
Аминогликозиды	
Амикацин, 30	-
Тобрамицин, 10	-
Гентамицин, 10	-
Стрептомицин, 10	20
Канамицин, 100	-
Апрамицин, 200	-
Гигромицин Б, 200	-
Бета-лактамы/Бета-лактамы + ингибитор бета-лактамаз	
Амоксициллин/клавулановая кислота, 30	-
Пиперациллин/тазобактам, 36	-
Пиперациллин/тазобактам, 110	-
Азтреонам, 30	-
Ампициллин, 200	10
Цефалоспорины	
Цефтазидим, 10	-
Цефокситин, 30	10
Цефепим, 30	-

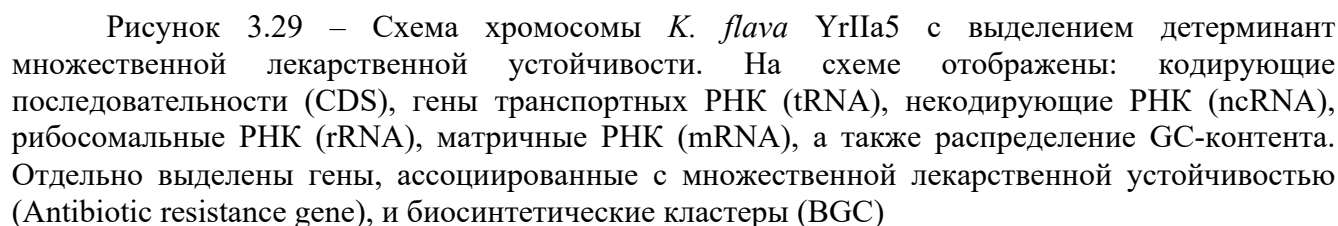
Продолжение Таблицы 3.8

Антибиотик, мкг	Зона ингибирования, мм
Цефалоспорины	
Цефтазидим, 30	-
Фторхинолоны	
Ципрофлоксацин, 5	-
Норфлоксацин, 5	-
Левифлоксацин, 50	-
Сульфаниламиды	
Триметоприм/сульфаметоксазол, 25	-
Триметоприм, 25	-
Линкозамиды	
Клиндамицин, 2	-
Линкомицин, 100	10
Макролиды	
Эритромицин, 15	-
Кларитромицин, 100	50
Прочие	
Нистатин, 20 (Макролидные полиены)	-
Тетрациклин, 25 (Тетрациклины)	20
Тетраценомицин Х, 25 (Антрациклины)	18
Фосфомицин, 20 (Фосфоновые)	-
Хлорамфеникол, 10 (Амфениколы)	-
Рифампицин, 5 (Рифамицины)	10
Ванкомицин, 30 (Гликопептиды)	45
Пенталенолактон, 40	-

«--» - не наблюдается антагонистической активности в отношении штамма YrIIa5.

Тестирование на антибиотикочувствительность выявило у YrIIa5 устойчивость к широкому кругу антибиотиков, представляющих такие классы как: β -лактамы, цефалоспорины, аминогликозиды, сульфаниламиды, фторхинолоны, макролиды, линкозамиды, что было показано в Таблице 3.8. Это позволяет рассматривать штамм YrIIa5 как природный мультирезистентный микроорганизм, эволюционирующий в естественных условиях, в отличие от «суперпатогенов», приобретающих множественную лекарственную устойчивость в стенах медицинских учреждений под давлением отбора [159].

Аннотация генома (Bakta v.1.9.4) и поиск в базах CARD и AMRFinderPlus позволили идентифицировать комплекс генов резистентности, кодирующих ферменты, которые участвуют как в специфических, так и в неспецифических механизмах устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, таким как: Спектиномицину, Пурамицину, Тосуфлоксацину, Норфлоксацину, Хлорамфениколу, Эноксацину, Новобиоцину, Дезоксихолату, Даунорубицину и Доксорубицину, Тетрациклину, Линермицину, Фосфомицину, Бицикломицину, а также гены



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* [159], а также гена, кодирующего белок YaaA, важный элемент антиоксидантной защиты клеток после перекисного стресса [159, 216]. Найденный в геноме YrIIa5 гомолог эффлюксного переносчика из семейства ACR3 может обеспечивать активный отток арсенитов и антимонитов из клеток, обеспечивая их устойчивость к мышьяку и другим ксенобиотикам [159, 217].

Характеристики генов резистентности, идентифицированных на Рисунке 3.28, включая их генетическую структуру, белковые продукты и связанные с ними фенотипические проявления резистентности, приведены в Таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Гены, кодирующие белки резистентности к лекарственным препаратам, в последовательности ДНК штамма *Krasilnikovella flava* YrIIa5

Ген	Кодируемый белок	GenBank accession	Формируемая устойчивость
<i>aacA4</i>	Аминогликозид N(6')-ацетилтрансфераза типа 1	AAA26550.1	Амикацин, Канамицин
<i>erm(A)</i>	Белок устойчивости к эритромицину	ABI75031.1	Эритромицин
<i>pbp2</i>	Пенициллин связывающий белок	ASD49678.1	Цефокситим
<i>hygBr</i>	Белок устойчивости к гигромицину	AFG20898.1	Гигромицин В
<i>AbaF</i>	Белок устойчивости к фосфомицину AbaF	ABO11759.2	Фосфомицин
<i>bmr3</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости 3	BAA08793.1	Тосуфлоксацин, Норфлоксацин, Левофлоксацин
<i>mdtH</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости MdtH	ABE06672.1	Норфлоксацин
<i>mdtL</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости MdtL	AAA62061.1	Хлорамфеникол
<i>mdtC</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости MdtC	ACB03248.1	Новобиоцин
<i>bmrA</i>	АВС-транспортер АТФ-связывающий/пермеазный белок множественной лекарственной устойчивости BmrA	CAB08051.1	бисбензимидазол, бромистый этидий, Доксорубин
<i>ddrA</i>	АТФ-связывающий белок устойчивости к доксорубину DdrA	EUA20793.1	Даунорубин/Доксорубин

Согласно литературным данным, многие механизмы устойчивости в бактериальных клетках обусловлены действием либо специфических ферментов модификаторов, либо эффлюксные помпы (ЭП), направленные на экспорт неспецифичных токсичных молекул, в том числе и антибиотиков [215]. Аннотирование генома YrIIa5 позволило детерминировать кодирующие последовательности, ассоциированные с различными механизмами резистентности к исследованным антимикробным препаратам. Геномный анализ выявил обширное количество генов ЭП, что может обеспечивать штамму множественную лекарственную устойчивость, а экспериментальные данные чувствительности подтвердили данное предположение.

ЭП играют важную роль в устойчивости к антибиотикам, тем самым их можно рассматривать как антибактериальные мишени. Разработка ингибиторов эффлюксных насосов бактерий может помочь улучшить терапевтический эффект в отношении мультирезистентных патогенов. Механизм действия ЭП сильно отличаются от других механизмов резистентности таких, например, как бета-лактамазы, которые в свою очередь действуют только на определенное семейство антибиотиков, а любая отдельная эффлюксная помпа способна к удалению из клетки широкого спектра антибиотиков, таким образом ингибирование работы ЭП увеличивает чувствительность бактерий к нескольким противомикробным препаратам. Существуют данные о том, что некоторые гены устойчивости к антибиотикам в том числе и транспортные трансмембранные белки у актиномицетов являются предковыми генами устойчивости к антибиотикам у патогенных бактерий, что может быть полезно при изучении механизмов устойчивости и борьбы с ними при лечении бактериальных инфекций [215].

3.1.4. Эволюционное происхождение генов устойчивости штамма

Krasilnikoviella flava YrIIa5

Для определения происхождения генов устойчивости был проведён филогенетический анализ (IQ-TREE, модель LG+G4, 1000 бутстреп-реплик) ключевых детерминант резистентности. Из всей совокупности генов устойчивости, представленных на Рисунке 3.28, для последующего молекулярно-эволюционного анализа были отобраны представители двух наиболее обширных и функционально значимых суперсемейств ЭП: ABC- и MFS-транспортёры. Такой выбор обусловлен тем, что именно эти классы белков играют ключевую роль в формировании фенотипической устойчивости, приводя к активному выведению антибиотиков из клетки. Для определения их эволюционного происхождения был проведен филогенетический анализ представленный на Рисунке 3.30.

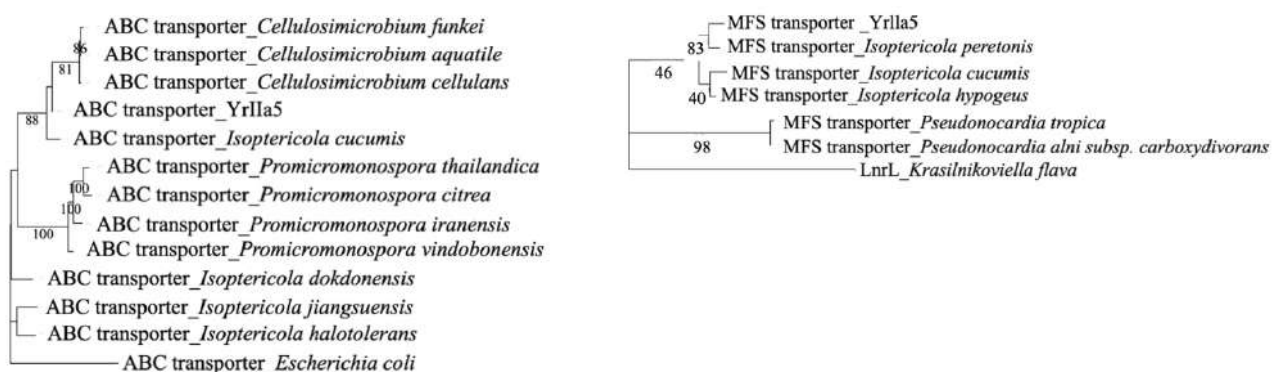


Рисунок 3.30 – Филогенетический анализ белков множественной лекарственной устойчивости *Krasilnikovia flava* YrIIa5 и его гомологов. Внешними группами служат гомологи из *Escherichia coli* и близкородственных таксонов. Деревья построены методом максимального правдоподобия с помощью сервиса IQ-TREE v3.1.3. Значения у узлов – бустреп-поддержка >70%

Топология деревьев показывает, что исследуемый ABC-транспортер YrIIa5 образует единый кластер с представителями родов *Cellulosimicrobium* и *Isoptericola* (бустреп-поддержка 88%), в то время как MFS-транспортер YrIIa5 демонстрирует наибольшее сродство с видами *Isoptericola* и *Pseudonocardia* (бустреп-поддержка 98%), указанные виды являются близкородственными представителями семейства *Promicromonosporaceae*, что является свидетельством вертикального наследования мембранных транспортеров (ABC и MFS) в пределах семейства.

В отличие от ранее рассмотренных ABC- и MFS-транспортеров, обеспечивающих резистентность за счет активного выведения антибиотика из клетки, ген хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*cat*) кодирует фермент, модифицирующий структуру антибиотика. В отличие от ЭП это принципиально иной механизм действия, а также данные гены могут активно участвовать в горизонтальном переносе, через плазмиды (*Staphylococcus aureus* и *Vibrio anguillarum*) и другие мобильные элементы генома [218]. Поэтому для оценки возможности горизонтального переноса гена *cat*, выявленного у YrIIa5, в филогенетический анализ были включены последовательности не только из представителей класса *Actinomycetes*, но и из филогенетически отдаленных таксонов, которые характеризуются наличием плазмидных и хромосомных вариантов данного фермента. Результаты филогенетического анализа представлены на Рисунке 3.31.

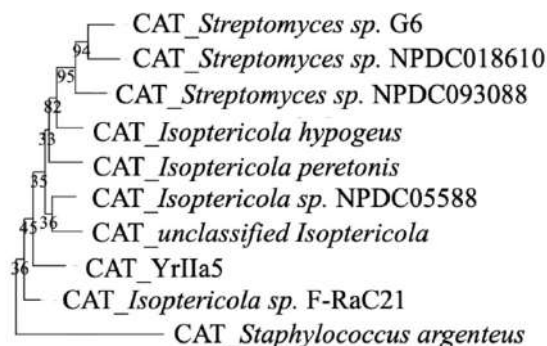


Рисунок 3.31 – Филогенетическое древо хлорамфениколацетилтрансфераз (CAT) штамма *Krasilnikovella flava* YrIIa5 и его гомологов. Деревья построены методом максимального правдоподобия с помощью сервиса IQ-TREE v3.1.3. Значения у узлов – бустреп-поддержка >70%. В качестве внешней группы использована последовательность из филогенетически отдаленного таксона *Staphylococcus argenteus*

Полученная топология дерева на Рисунке 3.31 показала, что исследуемый белок YrIIa5 формирует единый высокодостоверный кластер с представителями семейств *Promicromonosporaceae* и *Streptomycetaceae*, в то время как последовательности патогенных протеобактерий образуют отдельную, филогенетически далекую ветвь. Это указывает на преимущественно вертикальное (хромосомное) наследование гена *cat* в пределах актинобактерий и отсутствие недавних событий горизонтального переноса между исследуемым штаммом и патогенными микроорганизмами.

Для проверки гипотезы о мобильности генов резистентности был также проведён скрининг IS-элементов с использованием ISEScan (v1.7.3) и базы данных ISfinder. В геноме YrIIa5 обнаружены три частичных IS-элемента отраженных в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Характеристика IS-элементов в геноме штамма *Krasilnikovia flava* YrIIa5

Контиг	Семейство	Координаты	Длина, п.о.	E-value	TIR	Статус	ORF (транспозаза)
NODE_5	IS30	128,242–129,144	903	7.1e ⁻¹³	+	Частичный	741 п.н. (+)
NODE_5	IS21	351,967 – 354,282	2,316	1.1e ⁻¹⁴	+	Частичный	1,731 п.н. (+)
NODE_7	IS481	229,127 – 231,689	2,563	9.9e ⁻³³	+	Частичный	2,407 п.н. (+)

Сопоставление координат IS-элементов с координатами генов устойчивости показало, что ни один из IS-элементов не находится в непосредственной близости ~1000 п.о. от генов резистентности. Исключение составляет IS481 на NODE_7, в окрестности которого на расстоянии ~1,000 п.н. идентифицирован ген, кодирующий Fic-подобный белок-токсин (токсин-антитоксиновой системы). BLASTp-анализ подтвердил высокую идентичность (98%) этого белка с Fic-подобным белком вида *Cellulomonas avistercoris*, относящийся к одному семейству

Promicromonosporaceae. Fic-белки относятся к суперсемейству токсинов, которые в составе ТА-систем участвуют в регуляции клеточного метаболизма и стабильности мобильных генетических элементов [219]. Обнаружение Fic-гена в непосредственной близости от IS481 указывает на то, что данный локус представляет собой мобильный генетический островок, содержащий ТА-систему. Высокая степень идентичности с гомологом из типового штамма свидетельствует о вертикальном наследовании данного локуса.

Полученные данные указывают на то, что IS-элементы (IS30, IS21, IS481) в геноме YrIIa5 не являются драйверами множественной лекарственной устойчивости. Во-первых, все обнаруженные элементы являются частичными, что свидетельствует об их деградации и потере функциональной активности в ходе эволюции. Во-вторых, ни один из них не фланкирует гены устойчивости, что исключает их участие в их мобилизации. Обнаружение Fic-подобного токсина рядом с IS481 скорее указывает на остаточные механизмы поддержания стабильности этого мобильного элемента, а не на активную транслокацию генов резистентности.

Таким образом, геномный и функциональный анализ *K. flava* YrIIa5 позволил установить, что множественная лекарственная устойчивость сформирована преимущественно за счёт вертикального наследования генов резистентности и лишь незначительно дополнена древними событиями горизонтального переноса. Обнаруженные IS-элементы не ассоциированы с генами устойчивости и представлены частичными, вероятно, неактивными копиями, что указывает на эволюционную стабильность резистома. Эта стратегия принципиально отличается от резистомов клинических патогенов, где гены устойчивости часто организованы в мобильные островки.

Проведённое исследование охватывает все ключевые аспекты биологии актиномицетов, связанные с продукцией антибиотиков и формированием резистентности: от изучения регуляторных механизмов экспрессии биосинтетических кластеров *S. globisporus* bja209 до направленного геномного редактирования для повышения продуктивности *A. comptoni* A23^T и анализа эволюции генов резистентности у непродуцирующего штамма *K. flava* YrIIa5. Интеграция полученных данных позволяет сформулировать общие закономерности регуляции вторичного метаболизма и предложить стратегии для дальнейшего поиска новых природных соединений.

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 СОС-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-кодоны, 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 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baltz R. H. et al. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics // Natural product reports. – 2005. – V. 22. – №. 6. – P. 717-741.
2. Tomm H. A. et al. Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2019. – V. 46. – №. 9-10. – P. 1381-1400.
3. Matilla M.A. Facing crises in the 21st century: microfluidics approaches for antibiotic discovery // Microbial Biotechnology. 2022. V. 15. №. 2. P. 392-394.
4. Maglangit F. et al. A co-culturing approach enables discovery and biosynthesis of a bioactive indole alkaloid metabolite // Molecules. – 2020. – V. 25. – №. 2. – P. 256.
5. Onaka H. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes // The Journal of antibiotics. – 2017. – V. 70. – №. 8. – P. 865-870.
6. Zou X. et al. Genome engineering and modification toward synthetic biology for the production of antibiotics // Medicinal Research Reviews. – 2018. – V. 38. – №. 1. – P. 229-260.
7. Mitousis L. et al. An update on molecular tools for genetic engineering of actinomycetes—the source of important antibiotics and other valuable compounds // Antibiotics. – 2020. – V. 9. – №. 8. – P. 494.
8. Буюклян Ю. А. и др. Современные подходы к геномному редактированию биосинтетических кластеров антибиотиков в актиномицетах // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2023. – V. 15. – №. 3. – P. 4-16.
9. Ludwig W. et al. Road map of the phylum Actinobacteria // Bergey's manual® of systematic bacteriology. – Springer, New York, NY, 2012. – P. 1-28.
10. Лисовская П.В. Антимикробный потенциал актинобактерий, выделенных из природных экосистем: [Магистерская диссертация] / П.В. Лисовская – Федеральная территория «Сириус» - 101. – НТУ «Сириус».
11. Barka E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria* // Microbiology and molecular biology reviews. – 2016. – V. 80. – №. 1. – P. 1-43.
12. Lechevalier H., Lechevalier M. P. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique // annales de l'institut pasteur. – 21 street camille desmoulins, issy, 92789 moulinaux cedex 9, france : masson editeur, 1965. – V. 108. – №. 5. – P. 662.
13. Diminic J. et al. Evolutionary concepts in natural products discovery: what actinomycetes have taught us // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 41, № 2. P. 211–217.

14. Mayfield C. I. et al. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil // *Soil Biology and Biochemistry*. – 1972. – V. 4. – №. 1. – P. 79-91.
15. Goodfellow M., Williams S. T. Ecology of actinomycetes. – 1983. Wellington E. M. H., Toth I. K. Actinomycetes // *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*. – 1994. – V. 5. – P. 269-290.
16. Hiltner L. Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens: mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. // *Parey*. – 1903. – V. 3. – №. 5.
17. Girard G. et al. A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes // *Open biology*. – 2013. – V. 3. – №. 10. – P. 130073.
18. Atlas R. M. Principles of microbiology // (No Title). – 1997.
19. Flärdh K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces* // *Current opinion in microbiology*. – 2003. – V. 6. – №. 6. – P. 564-571.
20. Dyson P. Streptomyces. – 2009.
21. Bouizgarne B., Ait Ben Aouamar A. Diversity of plant associated actinobacteria // *Bacterial diversity in sustainable agriculture*. – 2014. – P. 41-99.
22. Cummins C. S., Harris H. Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups // *Microbiology*. – 1958. – V. 18. – №. 1. – P. 173-189.
23. Jüttner F., Watson S. B. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters // *Applied and environmental microbiology*. – 2007. – V. 73. – №. 14. – P. 4395-4406.
24. Ambarwati A. et al. Antibiotic produced by streptomycetes associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia // *African Journal of Microbiology Research*. – 2012. – V. 6. – №. 1. – P. 52-57.
25. Lee M. S. et al. Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus* // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – V. 19. – №. 2. – P. 83-86.
26. Deeble V. et al. Effects of temperature on production of antibiotics in *Streptomyces griseus* // *Journal of antibiotics*. – 2005. – P. 171-178.
27. Srivibool R. et al. Coastal soil actinomycetes: Thermotolerant strains producing N-Acylamino acid racemase // *ScienceAsia*. – 2004. – V. 30. – P. 123-126.
28. Basilio A. et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity // *Journal of applied microbiology*. – 2003. – V. 95. – №. 4. – P. 814-823.

29. Hodgson D. A. Primary metabolism and its control in *streptomyces*: a most unusual group of bacteria. – 2000.
30. Badji B. Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *actinomadura* et *nonomuraea* : дис. – Tizi-ouzou, 2006.
31. Harir M. et al. Streptomyces secondary metabolites // Basic biology and applications of actinobacteria. – IntechOpen, 2018.
32. Синева О. Н., Терехова Л. П. Направленное выделение актиномицетов редких родов из почвы // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – V. 60. – №. 7-8. – P. 27-33.
33. Subramani R., Aalbersberg W. Culturable rare *Actinomycetes*: diversity, isolation and marine natural product discovery // Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – V. 97. – №. 21. – P. 9291-9321.
34. Azman A. S. et al. Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity // Frontiers in microbiology. – 2015. – V. 6. – P. 856.
35. Nishijima M. et al. *Krasilnikoviella muralis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Promicromonosporaceae, isolated from the Takamatsuzuka Tumulus stone chamber interior and reclassification of *Promicromonospora flava* as *Krasilnikoviella flava* comb. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2017. – V. 67. – №. 2. – P. 294-300.
36. Kiriya A. R. et al. Genomic and Functional Analysis of a Multidrug Resistant Strain YRIIA5, a Member of the Rare Genus *Krasilnikoviella* // Microbiology. – 2025. – V. 94. – №. 1. – P. 134-138.
37. Brown-Elliott B. A. et al. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy // Clinical microbiology reviews. – 2006. – V. 19. – №. 2. – P. 259-282.
38. Sun H. et al. Complete genome sequence of *Nocardiopsis dassonvillei* type strain (IMRU 509 T) // Standards in genomic sciences. – 2010. – V. 3. – P. 325-336.
39. Meyer J. *Nocardiopsis*, a new genus of the order *Actinomycetales* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1976. – V. 26. – №. 4. – P. 487-493.
40. Priyanka S. et al. Characterisation and identification of antibacterial compound from marine actinobacteria: In vitro and in silico analysis // Journal of infection and public health. – 2019. – V. 12. – №. 1. – P. 83-89.
41. Cimmino T. et al. Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance // New Microbes and New Infections. – 2016. – V. 12. – P. 1-5.
42. Cornell C.R. et al. Molecular characterization of plasmids harbored by actinomycetes isolated from the great salt plains of oklahoma using PFGE and next generation whole genome sequencing // Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 2282.

43. Белик А. Р. и др. *Streptomyces phaeochromogenes* БВ-204–штамм-продуцент антрахинона К-1115А, нового ингибитора биосинтеза белка // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2024. – Т. 16. – №. 1. – С. 30-39.
44. Blaha G.M., Wade J.T. Transcription-translation coupling in bacteria // Annual Review of Genetics. – 2022. – V. 56. – P. 187-205.
45. Hirochika H. et al. Site-specific deletion in cauliflower mosaic virus DNA: possible involvement of RNA splicing and reverse transcription // The EMBO Journal. – 1985. – V. 4. – №. 7. – P. 1673-1680.
46. Redenbach M. et al. The linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) possesses a centrally located replication origin and shows significant homology to the transposon Tn4811 // Plasmid. – 1999. – V. 42. – №. 3. – P. 174-185.
47. Martin J.F. Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals // Journal of industrial microbiology and biotechnology. – 1992. – V. 9. – P. 73-90.
48. Walsh C.T., Fischbach M.A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules // Journal of the American Chemical Society. – 2010. – V. 132. – №. 8. – P. 2469-2493.
49. Donadio S. et. al. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics // Natural product reports. – 2007. – V. 24. – №. 5. – P. 1073-1109.
50. Schwecke T. et al. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – V. 92. – №. 17. – P. 7839-7843.
51. Tillett D. et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system // Chemistry & biology. – 2000. – V. 7. – №. 10. – P. 753-764.
52. Della Sala G. et al. Identification of the biosynthetic gene cluster of thermoactinoamides and discovery of new congeners by integrated genome mining and MS-Based molecular networking // Frontiers in Chemistry. – 2020. – V. 8. – P. 397.
53. Zhu C. et al. Identification and engineering of regulation-related genes toward improved kasugamycin production // Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – V. 100. – P. 1811-1821.
54. An Z. et al. Increasing the heterologous production of spinosad in *Streptomyces albus* J1074 by regulating biosynthesis of its polyketide skeleton // Synthetic and Systems Biotechnology. – 2021. – V. 6. – №. 4. – P. 292-301.
55. Omura S. et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2001. – V. 98. – № 21. – P. 12215–12220.

56. Martínez-Núñez M.A., López V.E.L. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry // Sustainable Chemical Processes. – 2016. – V. 4. – P. 1–8.
57. De Simeis D., Serra S. *Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production* // Antibiotics. – 2021. – V. 10. – № 5. – P. 483.
58. Ziemert N., Jensen P. R. Phylogenetic approaches to natural product structure prediction // Methods in enzymology. – Academic Press. 2012. – V. 517. – P. 161-182.
59. Tocchetti A. et al. Large inserts for big data: artificial chromosomes in the genomic era // FEMS microbiology letters. – 2018. – V. 365. – №. 9. – P. fny064
60. Bentley S. D. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2) // nature. – 2002. – V. 417. – №. 6885. – P. 141-147.
61. Bentley S. D. et al. SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3 (2) // Molecular microbiology. – 2004. – V. 51. – №. 6. – P. 1615-1628.
62. Chater K. F., Horinouchi S. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species // Molecular microbiology. – 2003. – V. 48. – №. 1. – P. 9-15.
63. Elliot M. A., Talbot N. J. Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi // Current opinion in microbiology. – 2004. – V. 7. – №. 6. – P. 594-601.
64. Hesketh A. et al. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis // Molecular microbiology. – 2001. – V. 39. – №. 1. – P. 136-144.
65. Jin W. et al. Cephamycin C production is regulated by relA and rsh genes in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064 // Journal of biotechnology. – 2004. – V. 114. – №. 1-2. – P. 81-87.
66. Jin W. et al. Two relA/spoT homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of *Streptomyces clavuligerus* // Microbiology. – 2004. – V. 150. – №. 5. – P. 1485-1493.
67. Bibb M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes // Current opinion in microbiology. – 2005. – V. 8. – №. 2. – P. 208-215.
68. Natsume R. et al. Crystal structure of a γ -butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) // Foundations of Crystallography. – 2004. – V. 60. – №. a1. – P. s153-s153.
69. Yamazaki H. et al. DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus* // Molecular microbiology. – 2004. – V. 53. – №. 2. – P. 555-572.

70. Kato J. et al. A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus* // Journal of bacteriology. – 2004. – V. 186. – №. 7. – P. 2206-2211.
71. Van Wezel G. P., McDowall K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances // Natural product reports. – 2011. – V. 28. – №. 7. – P. 1311-1333.
72. Brian P. et al. Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an absA-encoded putative signal transduction system // Journal of bacteriology. – 1996. – V. 178. – №. 11. – P. 3221-3231.
73. Anderson T. B. et al. Genetic and transcriptional analysis of absA, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor* // Molecular microbiology. – 2001. – V. 39. – №. 3. – P. 553-566.
74. Panina E. M. et al. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 17. – P. 9912-9917.
75. Shin J. H. et al. The zinc-responsive regulator Zur controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) // Journal of bacteriology. – 2007. – V. 189. – №. 11. – P. 4070-4077.
76. Rigali S. et al. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces* // EMBO reports. – 2008. – V. 9. – №. 7. – P. 670-675.
77. Koerten H. K. et al. The sugar 137 phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-138 family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of 139 development // Molecular microbiology. – 2006. – V. 61. – №. 5. – P. 1237-51.
78. Colson S. et al. Conserved cis-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of streptomycetes are DasR-responsive elements // Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2007. – V. 12. – №. 1-2. – P. 60-66.
79. Sprusansky O. et al. Identification of three new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* // Journal of bacteriology. – 2003. – V. 185. – №. 20. – P. 6147-6157.
80. Letzel A. C. et al. A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world // Natural Product Reports. – 2013. – V. 30. – №. 3. – P. 392-428.
81. Culp E. J. et al. Hidden antibiotics in actinomycetes can be identified by inactivation of gene clusters for common antibiotics // Nature Biotechnology. – 2019. – V. 37. – №. 10. – P. 1149-1154.

82. Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – V. 97. – №. 12. – P. 6640-6645.
83. Smith G. R. How RecBCD enzyme and Chi promote DNA break repair and recombination: a molecular biologist's view // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2012. – V. 76. – №. 2. – P. 217-228.
84. Thomason L. et al. Recombineer-ing: genetic engineering in bacteria using homologous recombination // Curr Protoc Mol Biol. – 2007. – V. 78. – №. 1.16. – P. 1-1.16.
85. Babakhani S., Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria // Journal of basic microbiology. – 2018. – V. 58. – №. 11. – P. 905-917.
86. Ooka T. et al. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes // Genome research. – 2009. – V. 19. – №. 10. – P. 1809-1816.
87. Gust B. et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 4. – P. 1541-1546.
88. Komatsu M. et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – V. 107. – №. 6. – P. 2646-2651.
89. Campo N. et al. Cre-loxP recombination system for large genome rearrangements in *Lactococcus lactis* // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – №. 5. – P. 2359-2367.
90. Yoon Y. G. et al. Cre/loxP-mediated excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome // Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. – 1998. – V. 14. – №. 3. – P. 89-95.
91. Jayaram M., Grainge I. Introduction to site specific recombination // The Dynamic Bacterial Genome. Cambridge University Press, New York, NY, USA. – 2005. – P. 33-81.
92. Hallet B., Sherratt D. J. Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements // FEMS microbiology reviews. – 1997. – V. 21. – №. 2. – P. 157-17.
93. Kühn R., M. Torres R. Cre/loxP recombination system and gene targeting // Transgenesis Techniques: Principles and Protocols. – 2002. – P. 175-204.
94. Petit M. A. Mechanisms of homologous recombination in bacteria. – 2005.
95. Tian X., Zhou B. Strategies for site-specific recombination with high efficiency and precise spatiotemporal resolution // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – V. 296

96. Santos L. D. F. et al. Marker-free genome engineering in *Amycolatopsis* using the pSAM2 site-specific recombination system // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – №. 4. – P. 828.
97. Parks A. R. et al. Conservative site specific recombination // *Molecular Life Sciences*. – 2018. – P. 119-127.
98. Raynal A. et al. Characterization of the attP site of the integrative element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens* // *Microbiology*. – 2002. – V. 148. – №. 1. – P. 61-67.
99. Smokvina T. et al. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes // *Gene*. – 1990. – V. 94. – №. 1. – P. 53-59.
100. Boccard F. et al. The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages // *The EMBO journal*. – 1989. – V. 8. – №. 3. – P. 973-980.
101. Combes P. et al. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the ϕ C31-encoded site-specific recombination system // *Journal of bacteriology*. – 2002. – V. 184. – №. 20. – P. 5746-5752.
102. Fernández-Martínez L. T., Bibb M. J. Use of the Meganuclease I-SceI of *Saccharomyces cerevisiae* to select for gene deletions in actinomycetes // *Scientific reports*. – 2014. – V. 4. – №. 1. – P. 1-6.
103. Ouedraogo J. et al. I-Sce I-mediated double-strand DNA breaks stimulate efficient gene targeting in the industrial fungus *Trichoderma reesei* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – V. 99. – P. 10083-10095.
104. Monteilhet C. et al. Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly site-specific endonuclease encoded by a group I intron // *Nucleic acids research*. – 1990. – V. 18. – №. 6. – P. 1407-1413.
105. Niu Y. et al. Engineering variants of the I-SceI homing endonuclease with strand-specific and site-specific DNA-nicking activity // *Journal of molecular biology*. – 2008. – V. 382. – №. 1. – P. 188-202.
106. Siegl T. et al. I-Sce I endonuclease: a new tool for DNA repair studies and genetic manipulations in streptomycetes // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – V. 87. – P. 1525-1532.
107. Li D. et al. Battling CRISPR-Cas9 off-target genome editing // *Cell Biology and Toxicology*. – 2019. – V. 35. – P. 403-406.
108. Li L. et al. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2018. – V. 84. – №. 18. – P. e00827-18.
109. Tao W. et al. CRISPR/Cas9-based editing of *Streptomyces* for discovery, characterization, and production of natural products // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1660.

110. Makarova K. S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems // Nat. Rev. Microbiol. – 2015. – V. 13. – №. 11. – P. 722-736.
111. Yosef I. et al. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli* // Nucleic acids research. – 2012. – V. 40. – №. 12. – P. 5569-5576.
112. Barrangou R., Marraffini L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity // Cell. – 2014. – V. 54. – P. 234-244.
113. Rath D. et al. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications // Biochimie. – 2015. – V. 117. – P. 119-128.
114. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. – 2012. – V. 337. – №. 6096. – P. 816-821.
115. Knott G. J., Doudna J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering // Science. – 2018. – V. 361. – №. 6405. – P. 866-869.
116. Karvelis T. et al. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements // Genome biology. – 2015. – V. 16. – P. 1-13.
117. Yñíguez-Gutierrez A. E., Bachmann B. O. Fixing the unfixable: the art of optimizing natural products for human medicine // Journal of medicinal chemistry. – 2019. – V. 62. – №. 18. – P. 8412-8428.
118. Cimmino T. et al. Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut // New Microbes and New Infections. – 2016. – V. 12. – P. 1-5.
119. Fonfara I. et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA // Nature. – 2016. – V. 532. – №. 7600. – P. 517-521.
120. Wiedenheft B. et al. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea // Nature. – 2012. – V. 482. – №. 7385. – P. 331-338.
121. Kormanec J. et al. Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces* // Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – V. 103. – P. 5463-5482.
122. Custodio A. B., Alcantara E. P. Identification of polyketide synthase gene clusters in a phage P1-derived artificial chromosome library of a Philippine strain of *Streptomyces* sp. PCS3-D2 // Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. – 2019. – V. 27. – №. 2. – P. 56-63.
123. Leskiw B. K. et al. The use of a rare codon specifically during development? // Molecular microbiology. – 1991. – V. 5. – №. 12. – P. 2861-2867.
124. Shao Z. et al. Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold // ACS synthetic biology. – 2013. – V. 2. – №. 11. – P. 662-669.
125. Culp E. J. et al. Hidden antibiotics in actinomycetes can be identified by inactivation of gene clusters for common antibiotics // Nature Biotechnology. – 2019. – V. 37. – №. 10. – P. 1149-1154.

126. Zhang M. M. et al. CRISPR–Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters // Nature chemical biology. – 2017. – V. 13. – №. 6. – P. 607-609.
127. Fu Y. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // Nature biotechnology. – 2013. – V. 31. – №. 9. – P. 822-826.
128. Hsu P. D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases // Nature biotechnology. – 2013. – V. 31. – №. 9. – P. 827-832.
129. Zhao Y. et al. Challenges and advances in genome editing technologies in *Streptomyces* // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – №. 5. – P. 734.
130. Hoff G. et al. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces* // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 1-11.
131. Chen P. et al. A Cas12a ortholog with stringent PAM recognition followed by low off-target editing rates for genome editing // Genome biology. – 2020. – V. 21. – №. 1. – P. 1-13
132. Tong Y. et al. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – V. 116. – №. 41. – P. 20366-20375.
133. UMEZAWA H. et al. On a new antibiotic, griseolutein, produced by *Streptomyces* // The Japanese Medical Journal. – 1950. – V. 3. – №. 2. – P. 111-117.
134. Volynkina I.A. et al. Mechanism-Based Approach to New Antibiotic Producers Screening among Actinomycetes in the Course of the Citizen Science Project // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – №. 9. – P. 1198.
135. Baranova A.A. et al. Chemical Ecology of *Streptomyces albidoflavus* Strain A10 Associated with Carpenter Ant *Camponotus vagus* // Microorganisms. – 2020. – V. 8. – №. 12. – P. 1948.
136. Terekhova L. P. et al. Comparative Appraisal of Some Inhibitors of Bacterial Growth Used as Selective Agents for the Isolation of Soil *Actinomycetes* // Antibiot. Khimioter. – 1991. – V. 36. – P. 5-8.
137. Zakharova O. S et al. Some approaches to the selective isolation of actinomycetes of the genus *Actinomadura* from soil // Microbiology. – 2003. – V. 72. – P. 110-113.
138. Shirling E. B. T., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species // International journal of systematic bacteriology. – 1966. – V. 16. – №. 3. – P. 313-340.
139. Буюклян Ю.А. и др. Кахакамид А – ингибитор ДНК-гиразы, выделенный из нового штамма-продуцента *Nocardioopsis dassonvillei* Т68 // Теоретическая и прикладная экология. – 2025. – №. 1. – С. 49-61.
140. Osterman I. A. et al. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – V. 60. – №. 12. – P. 7481-7489.

141. Schatz A. et al. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1944. – V. 55. – №. 1. – P. 66-69.
142. Леконцева Н.В. Структурно-функциональные исследования РНК- связывающих свойств белков семейства Lsm из архей: [Кандидатская диссертация] / Н.В. Леконцева – Москва - 123. Институт Белка РАН.
143. Miller E. M., Nickoloff J. A. *Escherichia coli* electrotransformation // *Electroporation protocols for microorganisms*. – Totowa, NJ : Humana Press, 1995. – P. 105-113.
144. Pigac J., Schrempf H. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – V. 61. – №. 1. – P. 352-356.
145. Коробейникова А.В. Исследования исследование роли рибосомных белков L5 и L25 в формировании функционально-активной бактериальной рибосомы: [Кандидатская диссертация] / А.В. Коробейникова. – Москва – Институт Белка РАН.
146. Михайлина А.О. Регуляторные свойства бактериальных и архейных рибосомных белков L1 и L4: [Кандидатская диссертация] / А.О. Михайлина. – Москва – Институт Белка РАН.
147. Mullis K. B., Faloona F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods in enzymology*. – Academic Press. – 1987. – V. 155. – P. 335-350.
148. Green M. R., Sambrook J. Isolation and quantification of DNA // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2018. – V. 2018. – №. 6. – P. top093336.
149. Roose-Amsaleg C. L et al. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples // *Applied Soil Ecology*. – 2001. – V. 18. – №. 1. – P. 47-60.
150. Kohlbacher O. et al. TOPP—the OpenMS proteomics pipeline // *Bioinformatics*. – 2007. – V. 23. – №. 2. – P. e191-e197.
151. Wang M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking // *Nature biotechnology*. – 2016. – V. 34. – №. 8. – P. 828-837.
152. Van Santen J. A. et al. The natural products atlas: an open access knowledge base for microbial natural products discovery // *ACS central science*. – 2019. – V. 5. – №. 11. – P. 1824-1833.
153. van Santen J. A. et al. The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products // *Nucleic acids research*. – 2022. – V. 50. – №. D1. – P. D1317-D1323.
154. Prjibelski A. et al. Using SPAdes de novo assembler // *Current protocols in bioinformatics*. – 2020. – V. 70. – №. 1. – P. e102.
155. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30. – №. 14. – P. 2068-2069.

156. Blin K. et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation // *Nucleic acids research*. – 2023. – V. 51. – №. W1. – P. W46-W50.
157. TYGS - Application Programming Interface [Internet resource] <https://tygs.dsmz.de/> (Accessed: 03.02.2025).
158. Ondov B. D. et al. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash // *Genome biology*. – 2016. – V. 17. – №. 1. – P. 132.
159. Кирий А.Р. и др. Геномный и функциональный анализ представителя редкого рода *Krasilnikovella* - штамма YPIIA5 с множественной антибиотикоустойчивостью // *Microbiology*. – 2025. – V. 94. – №. 1. – P. 98-103.
160. Lefort V. et al. FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program // *Molecular biology and evolution*. – 2015. – V. 32. – №. 10. – P. 2798-2800.
161. Niu G., Tan H. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology // *Trends in microbiology*. – 2015. – V. 23. – №. 2. – P. 110-119.
162. Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis // *The Journal of antibiotics*. – 1988. – V. 41. – №. 12. – P. 1711-1739.
163. Ciufu S. et al. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2018. – V. 68. – №. 7. – P. 2386-2392.
164. Cho G., Kwak Y. S. Evolution of antibiotic synthesis gene clusters in the *Streptomyces globisporus* TFH56, isolated from tomato flower // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2019. – V. 9. – №. 6. – P. 1807-1813.
165. Li X. et al. Complete genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, the producer of an enediyne antibiotic lidamycin // *Journal of Biotechnology*. – 2016. – V. 222. – P. 9-10.
166. Redenbach M. et al. The linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) possesses a centrally located replication origin and shows significant homology to the transposon Tn4811 // *Plasmid*. – 1999. – V. 42. – №. 3. – P. 174-185.
167. Hirochika H. et al. Site-specific deletion in cauliflower mosaic virus DNA: possible involvement of RNA splicing and reverse transcription // *The EMBO Journal*. – 1985. – V. 4. – №. 7. – P. 1673-1680.
168. Meinhardt F., Klassen R. (ed.). *Microbial linear plasmids* // Springer Science & Business Media. – 2007. – V. 7.
169. Blin K. et al. antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation // *Nucleic acids research*. – 2025. – P. gkaf334.

170. Полищук Л. В. Закономерности распределения бета-галактозидазных генов в хромосомах стрептомицетов // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2019. – №. 24. – С. 278-283.
171. Juers D. H. et al. LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance // Protein Science. – 2012. – V. 21. – №. 12. – P. 1792-1807.
172. KEGG. Available online: https://www.kegg.jp/module/sco_M00632 (accessed: 03 July 2025).
173. Kawaguchi H. et al. Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum* // Applied and environmental microbiology. – 2009. – V. 75. – №. 11. – P. 3419-3429.
174. Mota L. J. et al. Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis* // Molecular microbiology. – 1999. – V. 33. – №. 3. – P. 476-489.
175. Ishida S. et al. Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2011. – V. 34. – №. 6. – P. 917-920
176. Zakalyukina Y. V. et al. Nybomycin-producing *Streptomyces* isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Biochimie. – 2019. – V. 160. – P. 93-99
177. Wandersman C., Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores // Annu. Rev. Microbiol. – 2004. – V. 58. – №. 1. – P. 611-647.
178. Köster W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12 // Research in microbiology. – 2001. – V. 152. – №. 3-4. – P. 291-301.
179. Mies K. A. et al. Ternary complex formation facilitates a redox mechanism for iron release from a siderophore // Biometals. – 2006. – V. 19. – №. 2. – P. 115-126.
180. Flores F. J., Martín J. F. Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes // Biochemical Journal. – 2004. – V. 380. – №. 2. – P. 497-503.
181. Schupp T. et al. Cloning and expression of two genes of *Streptomyces pilosus* involved in the biosynthesis of the siderophore desferrioxamine B // Gene. – 1988. – V. 64. – №. 2. – P. 179-188.
182. Imbert M. et al. Comparison of the main siderophores produced by some species of *Streptomyces* // Current Microbiology. – 1995. – V. 31. – №. 2. – P. 129-133.
183. Ronan J. L. et al. Desferrioxamine biosynthesis: diverse hydroxamate assembly by substrate-tolerant acyl transferase DesC // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2018. – V. 373. – №. 1748. – P. 20170068.
184. Barry S. M., Challis G. L. Recent advances in siderophore biosynthesis // Current Opinion in Chemical Biology. – 2009. – V. 13. – №. 2. – P. 205-215.

185. Barona-Gómez F. et al. Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145 // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – V. 126. – №. 50. – P. 16282-16283.
186. Reynolds D. M. et al. Grisein, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces griseus* // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1947. – V. 64. – №. 1. – P. 50-54.
187. Тадеуш К. и др. Антибиотики: Происхождение, природа и свойства. – Польского гос. мед. изд-во, 1969.
188. Stapley E.O., Ormond R.E. Similarity of albomycin and grisein // Science. – 1957. – V. 125. – P. 587–589.
189. Wang M. et al. Biosynthesis and chemical synthesis of albomycin nucleoside antibiotics // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – №. 4. – P. 438.
190. Benz G. et al. Konstitution der Desferriform der Albomycine $\delta 1$, $\delta 2$, ϵ // Angewandte Chemie International Edition in English. – 1982. – V. 21. – №. S7. – P. 1322-1335.
191. Stefanska A. L. et al. A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species // The Journal of antibiotics. – 2000. – V. 53. – №. 12. – P. 1346-1353.
192. Braun V. et al. Sideromycins: tools and antibiotics // Biometals. – 2009. – V. 22. – №. 1. – P. 3-13.
193. Górská A. et al. Siderophore–drug complexes: potential medicinal applications of the ‘Trojan horse’ strategy // Trends in pharmacological sciences. – 2014. – V. 35. – №. 9. – P. 442-449.
194. Travin D. Y., Severinov K., Dubiley S. Natural Trojan horse inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases // RSC Chemical Biology. – 2021. – V. 2. – №. 2. – P. 468-485.
195. Shao R., Zhen Y. Enediynes anticancer antibiotic lidamycin: chemistry, biology and pharmacology // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2008. – V. 8. – №. 2. – P. 123-131.
196. Rahlwes K. C. et al. Cell walls and membranes of *Actinobacteria* // Bacterial Cell Walls and Membranes. – 2019. – P. 417-469.
197. Cobb R. E. et al. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system // ACS synthetic biology. – 2015. – V. 4. – №. 6. – P. 723-728.
198. Zakalyukina Y. V. et al. *Amycolatopsis camponoti* sp. nov., new tetracenomycin-producing actinomycete isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Antonie van Leeuwenhoek. – 2022. – V. 115. – №. 4. – P. 533-544.
199. English R. S. et al. Transformation of *Saccharopolyspora erythraea* by electroporation of germinating spores: construction of propionyl Co-A carboxylase mutants // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 1998. – V. 21. – №. 4-5. – P. 219-224.

200. Simon R. et al. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria // *Biotechnology*. – 1983. – V. 1. – №. 9. – P. 784-791.
201. Wang Y. et al. High-efficiency genome editing of *Streptomyces* species by an engineered CRISPR/Cas system // *Methods in enzymology*. – Academic Press. – 2016. – V. 575. – P. 271-284.
202. Thoma L., Muth G. Conjugative DNA-transfer in *Streptomyces*, a mycelial organism // *Plasmid*. – 2016. – V. 87. – C. 1-9.
203. Xu J. et al. Optimized guide RNA structure for genome editing via Cas9 // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – №. 55. – C. 94166.
204. Osterman I.A. et al. Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel // *Nat. Chem. Biol.* – 2020. – V. 16. – № 10. – P. 1071–1077.
205. Mitousis L. et al. CRISPR-Cas in actinomycetes: still a lot to be discovered // *MicroLife*. – 2025. – V. 6. – P. uqaf010.
206. Wietzorrek A., Bibb M. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold // *Molecular microbiology*. – 1997. – T. 25. – №. 6. – C. 1181.
207. Yan Y., Xia H. The roles of SARP family regulators involved in secondary metabolism in *Streptomyces* // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – T. 15. – C. 1368809.
208. Tanaka A. et al. AfsR recruits RNA polymerase to the afsS promoter: a model for transcriptional activation by SARPs // *Journal of molecular biology*. – 2007. – T. 369. – №. 2. – C. 322-333.
209. Yang Z. et al. Characterization of the noncanonical regulatory and transporter genes in atratumycin biosynthesis and production in a heterologous host // *Marine Drugs*. – 2019. – T. 17. – №. 10. – C. 560.
210. Xiao S. H. U. et al. The effects on antibiotic production in a hetrologous system by sare4854, a novel member of streptomyces actibiotic regulatory protein family (SARP) from a marine microorganism *Salinispora arenicola* CNH643 DSM 44819 // *Journal of Huazhong Normal University*. – 2014. – T. 48. – №. 1.
211. Stackebrandt E. et al. // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2015. – P. 1-9.
212. Wong T. K. F. et al. IQ-TREE 3: phylogenomic inference software using complex evolutionary models // *Molecular Biology and Evolution*. – 2026. – T. 43. – №. 5. – P. msag117.
213. Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS Is an Automated High-Throughput Platform for State-of-the-Art Genome-Based Taxonomy // *Nature Communications*. – 2019. – V. 10. – №. 1. – P. 2182.

214. Ciufu S. et al. Using Average Nucleotide Identity to Improve Taxonomic Assignments in Prokaryotic Genomes at the NCBI // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – V. 68. – №. 7. – P. 2386–2392.

215. Фелькер И. Г. и др. Перспективы и препятствия для клинического применения ингибиторов эффлюксных помп *Mycobacterium tuberculosis* // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2021. – Т. 38. – №. 5. – С. 317–339.

216. Fuangthong M. et al. OhrR Is a Repressor of ohrA, a Key Organic Hydroperoxide Resistance Determinant in *Bacillus Subtilis* // Journal of Bacteriology. – 2001. – V. 183. – №. 14. – P. 4134–4141.

217. Liu Y. et al. The YaaA Protein of the Escherichia Coli OxyR Regulon Lessens Hydrogen Peroxide Toxicity by Diminishing the Amount of Intracellular Unincorporated Iron // Journal of Bacteriology. – 2011. – V. 193. – №. 9. – P. 2186–2196.

218. Zhang G. et al. A novel family of intrinsic chloramphenicol acetyltransferase CATC in *Vibrio parahaemolyticus*: naturally occurring variants reveal diverse resistance levels against chloramphenicol // International journal of antimicrobial agents. – 2019. – Т. 54. – №. 1. – С. 75-79.

219. Veyron S., Peyroche G., Cherfils J. FIC proteins: from bacteria to humans and back again // Pathogens and disease. – 2018. – Т. 76. – №. 2. – С. fty012.