

РЕЗИСТОМ *Streptomyces rimosus* – РЕЗЕРВУАР ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДНЫМ АНТИБИОТИКАМ

© 2023 М.Г. Алексеева*, Н.Н. Рудакова, А.В. Ратькин,
Д.А. Мавлетова, В.Н. Даниленко

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: alekseevamg@mail.ru

Поступила в редакцию 16.03.2023

После доработки 20.04.2023

Принята к публикации 20.04.2023

Изучение аминогликозидацетилтрансфераз у актинобактерий рода *Streptomyces* является составной частью исследования почвенных бактерий как основного резервуара и возможного источника генов лекарственной устойчивости. Ранее нами в штамме *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (продуценте окситетрациклина), устойчивом к большинству природных аминогликозидных антибиотиков (АГ), были идентифицированы и биохимически охарактеризованы 3 аминогликозидфосфотрансферазы, которые обуславливают устойчивость к канамицину, неомицину, паромомицину, стрептомицину и гигромицину В. В представленной работе было показано, что устойчивость к остальным АГ у данного штамма связана с наличием фермента аминогликозидацетилтрансферазы, относящейся к подсемейству AAC(2'). Индуцирование экспрессии гена, обозначенного нами как *aac(2')-If*, в клетках *Escherichia coli* определяет устойчивость к широкому спектру природных АГ (неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину и паромомицину) и к повышению минимальных ингибирующих концентраций данных антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: множественная лекарственная устойчивость, *Streptomyces rimosus*, аминогликозид-ацетилтрансферазы, МИК аминогликозидных антибиотиков.

DOI: 10.31857/S0320972523060015, EDN: EDCRBD

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость к антибиотикам является одной из самых больших проблем в современной медицине и глобальной угрозой для здравоохранения, обусловленных катастрофическим распространением клинических штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Окружающая среда является крупнейшим источником и резервуаром резистентности – почвенные, водные, атмосферные, связанные с животными и искусственные экосистемы содержат элементы устойчивости к антибиотикам [1, 2]. Возможность передачи генетических элементов устойчивости между бактериями в смешанных популяциях приводит к увеличению горизонтального переноса, появлению и селекции устойчивых форм бактерий. Гены устойчивости к антибиотикам гипотетически берут начало в бактериях, отно-

сящихся к роду *Streptomyces*, которые являются продуцентами широкого спектра антибиотиков и значительным резервуаром генов устойчивости к антибиотикам в почвах [3, 4].

Множественная лекарственная устойчивость к аминогликозидным антибиотикам (АГ) обусловлена наличием в геномах бактерий модифицирующих ферментов, относящихся к трем подклассам: аминогликозидфосфотрансферазам (АРН), аминогликозид-3-N-ацетилтрансферазам (ААС) и аминогликозиднуклеотидилтрансферазам (АНТ). Индуцирование синтеза ферментов, модифицирующих аминогликозиды, представляет собой стратегию выживания устойчивых к антибиотикам бактерий [4, 5]. Ферменты АРН и ААС идентифицированы и охарактеризованы в основном у штаммов-продуцентов аминогликозидов, таких как *Streptomyces griseus* (продуцент стрептомицина), *Streptomyces kanamyceticus* (продуцент

Принятые сокращения: АГ – аминогликозидные антибиотики; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ААС – аминогликозидацетилтрансферазы; АРН – аминогликозидфосфотрансферазы.

* Адресат для корреспонденции.

канамицина), *Streptomyces fradiae* (продуцент неомидина). Данные штаммы устойчивы и к другим АГ, продуцентами которых они не являются. Также было показано широкое распространение множественной устойчивости к АГ у АГ-непродуцирующих актиномицетов [6, 7].

В то же время первичный биоинформатический анализ показал, что гены, аннотированные как *aph* и *aac*, широко представлены во многих геномах актинобактерий рода *Streptomyces*. При этом ферменты, обуславливающие устойчивость к АГ, в настоящее время мало изучены – некоторые из них связаны с устойчивостью к антибиотикам, остальные имеют другие функции, в том числе могут участвовать в коммуникациях с другими почвенными организмами. Поэтому важной задачей является выявление и характеристика новых ферментов, участвующих в устойчивости к аминогликозидным антибиотикам [6, 8].

Ранее было установлено, что штамм *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (продуцент окситетрациклина) обладает устойчивостью к большинству природных АГ. В штамме *S. rimosus* ATCC 10970 нами были идентифицированы и биохимически охарактеризованы аминогликозидфосфотрансферазы: APH(3')-VIII, APH(3'')-Id и AphSR2, обуславливающие устойчивость к канамицину, неомидину, паромидину, стрептомицину и гигромицину В. Получены пространственные структуры APH(3')-VIII и APH(3'')-Id (в апоформе и в комплексе со стрептомицином и ADP) [9–13].

В настоящей работе проводилась идентификация в геноме *S. rimosus* ATCC 10970 аминогликозидацетилтрансфераз, которые потенциально могут обуславливать устойчивость штамма к АГ. Мы идентифицировали фермент, относящийся к описанному ранее подсемейству, обозначенный нами как AAC(2')-If. При клонировании гена, кодирующего данный фермент, в клетках *Escherichia coli* установлено, что он определяет устойчивость к широкому спектру природных АГ; были определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) аминогликозидных антибиотиков для клеток *E. coli*, экспрессирующих *aac(2')-If*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, векторы, среды и условия культивирования. В работе использовали штаммы: *S. rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 [14], *E. coli* DH5a (F⁻, Φ 80 ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169) («Promega»,

США) [15], *E. coli* BL21(DE3) (F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), gal λ (DE3)) («Novagen», США) [16] и *E. coli* NiCo21(DE3) (can::CBD flhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int:: i21 Δnin5) («New England Biolabs», США) [17]. Для клонирования использовали экспрессионные векторы pET16b и pET32a («Novagen») [16], содержащие His-Tag в N-концевой области для выделения и очистки рекомбинантных белков.

Штамм *S. rimosus* ATCC 10970 выращивали на жидкой среде YEME, содержащей 25% сахарозы [18]. Для выращивания клеток *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон), твердые среды содержали 2% (w/v) агара [19]. Для обеспечения селективного роста клеток, содержащих плазмиды, добавляли ампициллин (100 мкг/мл).

Манипуляции с ДНК. Геномную ДНК штамма *S. rimosus* ATCC 10970 выделяли методом, изложенным в руководстве Kieser et al. [18]. Выделение плазмидной ДНК, получение компетентных клеток *E. coli*, трансформацию и анализ рекомбинантных плазмид проводили стандартными методами [19]. Фрагмент ДНК, кодирующий AAC(2')-If *S. rimosus*, амплифицировали с геномной ДНК с использованием набора Phusion High-Fidelity PCR Master Mix («Thermo Fisher Scientific», Литва) на минциклере PTC-0150 («MJ Research Inc.», США). Для амплификации были сконструированы олигонуклеотиды: AAC-SrN1 и AAC-SrC1 – для клонирования гена *aac(2')-If* в плазмиду pET16b по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI и олигонуклеотиды: AAC-SrN2 и AAC-SrC2 – для клонирования гена *aac(2')-If* в плазмиду pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе («Синтол», Россия), представлены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'*
AAC-SrN1	tcgtcatatgatgaccgacgcacacccct
AAC-SrC1	agccggatccctaccagacgtccccaact
AAC-SrN2	tcgcgatccatgaccgacgcacacccct
AAC-SrC2	ccgcaagcttctaccagacgtccccaact

* Сайты для эндонуклеаз рестрикции выделены подчеркиванием.

Экспрессия гена *aac(2')-If* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в *E. coli*. Клетки *E. coli*, содержащие плазмиды pET16b:*aac(2')-If* и pET32a:*aac(2')-If*, выращивали на качалке в жидкой среде (L-бульон) с ампициллином при 37 °С до оптической плотности 0,6 при 625 нм (~2 ч), затем индуцировали экспрессию добавлением изопропил-D-тиогаляктозида (ИПТГ) до финальной концентрации 0,5 и 1,0 мМ. Далее проводили культивирование при 28 °С в течение 18 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин, 4 °С) и хранили в морозильной камере при –20 °С. Клетки размораживали и суспендировали в буфере для образцов, содержащем 62,5 мМ Tris-HCl (рН 6,8), 5% глицерина, 2% 2-меркаптоэтанола, 0,1% SDS и 0,001% бромфенолового синего, затем нагревали при 95 °С в течение 10 мин. Растворимую фракцию белков анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном Ds-Na-ПААГ с использованием маркера молекулярной массы белков SM0441 («Fermentas», Литва). В качестве контроля анализировали растворимые фракции белков штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащих плазмиды pET16b и pET32a без вставки.

Анализ устойчивости к аминогликозидным антибиотикам. Антимикробная активность для клеток *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих AAC(2')-If, определялась как МИК с использованием двух методов: метода диффузии с использованием стандартных дисков и метода линейных разведений. В качестве контроля анализировали клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиду pET32a.

Для диско-диффузионного метода [20] чашки с LB-агаром, содержащим 10 мкг/мл ИПТГ, инокулировали путем равномерного покрытия их бактериальными культурами в концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. Бумажные диски, содержащие АГ, помещали на чашки с LB-агаром, инкубировали при 37 °С в течение 18 ч, затем измеряли диаметры зон вокруг дисков, в которых отсутствовал рост клеток.

МИК для аминогликозидных антибиотиков определяли методом разведения в бульоне в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [21]. Клетки *E. coli* выращивали в 2 мл бульона Мюллера–Хинтона (МНВ) до плотности 0,3 при 625 нм для адаптации к стандарту 0,5 McFarland (мера плотности культуры; он соответствует значению $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), а затем разбавляли до конечной плотности 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. В пробирки, содержащие 2-кратные разведения антибиотиков в 2 мл МНВ,

добавляли по 100 мкл культуры клеток. Для индуцирования экспрессии AAC(2')-If в пробирки добавляли IPTG (100 мкМ). После культивирования в течение 18 ч при 25 °С определяли значения МИК как самые низкие концентрации АГ, которые приводили к полному ингибированию роста (что определялось спектрофотометрически при 625 нм).

Биоинформатический анализ. Последовательности аминокликозидацетилтрансфераз (AAC) штамма *S. rimosus* ATCC 10970 были получены из базы данных NCBI. Для сравнения их с известными по литературе AAC использовали программы Blastp [22]; для сопоставления с последовательностями белков, представленных в базе данных PDB, с известными 3D-структурами – SAS [23]; для множественных выравниваний аминокислотных последовательностей использовали алгоритм ClustalW [24].

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоинформатический анализ аминокликозид-ацетилтрансфераз штамма *S. rimosus* ATCC 10970. В геноме штамма ATCC 10970 [14] аннотировано 13 генов N-ацетилтрансфераз семейства GNAT с номерами локусов генов: SRIM_009260; SRIM_011135; SRIM_012310; SRIM_018100; SRIM_020380; SRIM_020760; SRIM_025200; SRIM_029930; SRIM_030810; SRIM_033455; SRIM_038510; SRIM_040130; SRIM_040160. Все выявленные N-ацетилтрансферазы содержат домены «NAT_SF» и сайты связывания с коэнзимом А.

Сравнение аминокислотных последовательностей всех выявленных в *S. rimosus* ферментов N-ацетилтрансфераз с последовательностями известных ранее аминокликозидацетилтрансфераз, относящихся к подсемействам AAC(1), AAC(3), AAC(2') и AAC(6'), с использованием программ BLAST и SAS показало, что только один из них (SRIM_030810) имеет степень идентичности 52,1% с AAC(2')-Ic *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank: CCP42991.1, Код PDB: 1m44) и 50,0% – с AAC(2')-Id *Mycobacterium smegmatis* (GenBank: AIU12332.1, Код PDB: 7crm).

Для подсемейства AAC(2') в настоящее время идентифицирован только один подкласс AAC(2')-I. Ген, кодирующий AAC(2')-Ia, был обнаружен в хромосоме условно-патогенной бактерии *Providencia stuartii*, AAC(2')-Ib идентифицирован у *Mycobacterium fortuitum*,

AAC (2') -Sr	-----MTDAHPLLAHTAELDARTRAAAKALLHDVFE-----GDMTDEDW	39
AAC (2') -Ia	-----MGIEYRSLHTSQTLLSEKEALYDLLIEGFE-----GDFSHTDDF	38
AAC (2') -Ib	MPFQDVSAPVVRGGIILHTARLVHTSDLDQETREGARRMVEIAFE-----GDFSADAW	51
AAC (2') -Ic	-----MHTQVHTARLVHTADLDSETRQDIRQMVTAFA-----GDFTEITDW	41
AAC (2') -Id	MLTQHVSEARTRGAIHTARLIHTSDDLQETRDGARRMVEIAFRDPSGSDSFTDDFTDDDW	60
AAC (2') -Ie	-----MDTHHVHTARLVHTADLDGETLRLRQOMVTAFA-----GDFDETGW	42
AAC (2') -Sr	DHALGGVHALVWEGEELIGHASVVQRQMVHAG-----RPLRCGYVEGVVRADRRGRGHG	94
AAC (2') -Ia	AHTLGGMHVMAFDQQLVGHVAIIQRHMALDN-----TPISVGYVEAMVVEQSYRRQIG	93
AAC (2') -Ib	EHALGGMHAFICHHGALIAHAAVVQRRLLYRD-----TALRCGYVEAVAVREDWRGQGLA	106
AAC (2') -Ic	EHTLGGMHALIWHHGAIIAHAAVIQRRLIYRG-----NALRCGYVEGVAVRADWRGQRLV	96
AAC (2') -Id	DHALGGMHALISHHGALIAHGAVVQRRLMYRGPDRGHALRCGYVEAVAVREDRRGDGLG	120
AAC (2') -Ie	EHALGGMHALIWRHGTIIAHAAVVQRRLFYHG-----NALRCGYLEGVAVRKDCRGRGLV	97
AAC (2') -Sr	AAMMTALERVVVRDAYDLGALSASDGAADFYAARGWQLWRGFSYTLAPG-GLERTEEEDGG	153
AAC (2') -Ia	RQLMLQTNKIIASCYQLGLLSASDDGQKLYHSVGVQIWKGLFELKQG-SYIRSIIEEGG	152
AAC (2') -Ib	TAVMDAVEQVLRGAYQLGALSASDTARGMYLSRGWLPWQGPSTSVLQPA-GVTRTPEDDEG	165
AAC (2') -Ic	SALLDAVEQVMRGAYQLGALSASSARARRLYASRGWLPWHGPTSVLAPT-GPVRTPDDDG	155
AAC (2') -Id	TAVLDALEQVIRGAYQIGALSASDIARPMYIARGWLSWEGPTSVLTPTEGIVRTPEDDRS	180
AAC (2') -Ie	HALLDAIEQVIRGAYQFGALSASSDRARRVYMSRGWLPWLGPSTSVLAPT-GVIRTPDDDG	156
AAC (2') -Sr	IYVLPGAV----PLDLTGDLACDWRSGDVW	179
AAC (2') -Ia	V----MGWKADGEVDFATASLYCDFRGGDQW	178
AAC (2') -Ib	LFVLPVGLPAGMELDTTAEITCDWRDGDVW	195
AAC (2') -Ic	VFVLPIDI----SLDTSAEIMCDWRAGDVW	181
AAC (2') -Id	LFVLPVDLPDGLELDTAREITCDWRSGDPW	210
AAC (2') -Ie	VFVLPVGI----NPDITSSGLMCDWRAGNVW	182

Рис. 1. Выравнивание последовательностей AAC(2')-If (AAC(2')-Sr) с AAC(2')-Ia *P. stuartii*, AAC(2')-Ib *M. fortuitum*, AAC(2')-Ic *M. tuberculosis*, AAC(2')-Id *M. smegmatis* и AAC(2')-Ie *M. leprae*. Консервативные аминокислоты, характерные для AAC(2')-I, выделены серым цветом

AAC(2')-Ic – у *M. tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*, AAC(2')-Id – у *M. smegmatis*, AAC(2')-Ie – у *Mycobacterium leprae*. Ферменты подсемейства AAC(2') способны как к N-, так и к O-ацетилированию многих аминокликозидных субстратов: канамицина, паромомицина, гентамицина, амикацина и тобрамицина [25–27].

Степень идентичности (сходства) аминокислотных последовательностей между SRIM_030810 (AAC(2')-Sr) и AAC(2')-Ia, AAC(2')-Ib, AAC(2')-Ic, AAC(2')-Id, AAC(2')-Ie составляет 36,5 (64,9)%; 51,7 (80,1)%; 51,2 (78,5)%; 48,2 (72,8)%; и 48,6 (74,6)% соответственно. Выравнивание последовательностей (рис. 1) показывает, что AAC(2')-Sr содержит все консервативные аминокислоты [28], характерные для последовательностей ферментов подсемейства AAC(2'), поэтому мы обозначили этот фермент как AAC(2')-If.

Клонирование гена *aac(2')-If* в *E. coli* и анализ экспрессии. На первом этапе проводили клонирование гена *aac(2')-If* в составе экспрессионного вектора pET16b. Для изучения экспрессии гена *aac(2')-If* в *E. coli* про-

водили выращивание штаммов BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащих рекомбинантную плазмиду pET16b:*aac(2')-If*, в жидкой среде LB с индукцией ИПТГ, затем клетки осаждали центрифугированием и анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном Ds-Na-ПААГ. Анализ электрофореграммы показал, что ген *aac(2')-If* не экспрессируется в *E. coli* в составе экспрессионного вектора pET16b.

В связи с этим проводили клонирование гена *aac(2')-If* в составе экспрессионного вектора pET32a, содержащего последовательность гена тиоредоксина в N-концевой области. Полученные результаты (рис. 2) показали, что в клетках штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3) наблюдалась дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 37 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка AAC(2')-If в сумме с молекулярной массой белка линкера плазмиды pET32a, содержащей тиоредоксин. Максимальная экспрессия гена *aac(2')-If* была установлена в штамме *E. coli* BL21(DE3).

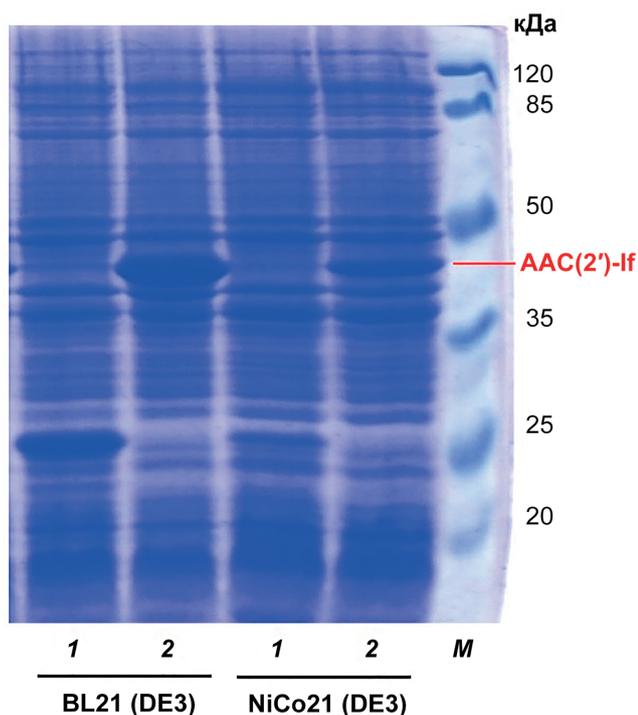


Рис. 2. Электрофореграмма растворимой фракции белков AAC(2')-If штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo21(DE3), содержащих плазмиды: 1 – pET32a, 2 – pET32a:aac(2')-If; M – маркер молекулярной массы белков SM0441

Исследование спектра и уровня устойчивости *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a:aac(2')-If, к аминогликозидным антибиотикам. Для определения спектра устойчивости клеток *E. coli* BL21(DE3), экспресси-

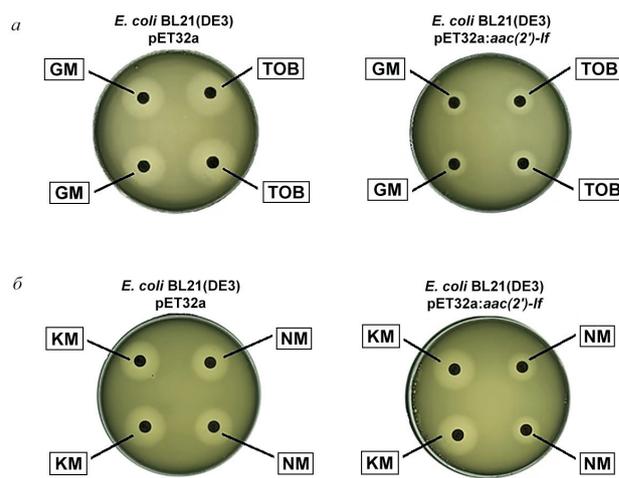


Рис. 3. Анализ спектра устойчивости клеток *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих ген *aac(2')-If*, к АГ методом стандартных дисков: а – к гентамицину и тобрамицину; б – к канамицину и неомицину. КМ – канамицин; NM – неомицин; GM – гентамицин; TOB – тобрамицин

рующих ген *aac(2')-If*, к АГ мы использовали метод стандартных дисков. Установлено, что экспрессия гена *aac(2')-If* обеспечивает устойчивость клеток *E. coli* BL21(DE3) к широкому спектру природных АГ: неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину и паромомицину (табл. 2, рис. 3). Полученные результаты согласуются с биоинформатическим анализом, согласно которому данный ген отнесен к подсемейству AAC(2').

Мы определили МИК АГ с использованием метода 2-кратных разведений антибиотиков

Таблица 2. Исследование спектра устойчивости *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиду pET32a:aac(2')-If, к аминогликозидным антибиотикам

Антибиотики		BL21(DE3) pET32a	BL21(DE3) pET32a:aac(2')-If
Название	концентрация, мкг/диск	диаметр зоны, мм*	
Канамицин	30	21 ± 0,5	21 ± 0,5
Неомицин	30	20 ± 0,5	# 15 ± 0,5
Паромомицин	10	17 ± 0,5	# 7 ± 0,5
Стрептомицин	10	22 ± 0,5	22 ± 0,5
Гентамицин	10	22 ± 0,5	# 15 ± 0,5
Тобрамицин	10	26 ± 0,5	# 17 ± 0,5
Сизомицин	10	25 ± 0,5	# 19 ± 0,5
Амикацин	30	24 ± 0,5	24 ± 0,5

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

Достоверное отличие от контроля (BL21(DE3) pET32a), $p < 0,01$.

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) аминогликозидных антибиотиков

АГ-антибиотик	Штаммы <i>E. coli</i> ; МИК, мкг/мл*	
	BL21(DE3) pET32a	BL21(DE3) pET32a: <i>aac(2')-If</i>
Гентамицин	4 ± 1	80 ± 2 [#]
Сизомицин	4 ± 1	64 ± 2 [#]
Паромомицин	16 ± 2	250 ± 5 [#]
Тобрамицин	8 ± 2	120 ± 4 [#]
Неомицин	16 ± 2	120 ± 4 [#]
Канамицин	16 ± 2	16 ± 2
Стрептомицин	16 ± 2	16 ± 2

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

[#] Достоверное отличие от контроля (BL21(DE3) pET32a), $p < 0,01$.

в жидкой среде. Полученные результаты (табл. 3) показывают, что индукция экспрессии гена *aac(2')-If* приводит к 20-кратному увеличению МИК гентамицина — с 4 до 80 мкг/мл. Аналогичные изменения наблюдались для сизомицина, паромомицина и тобрамицина (15–16-кратное увеличение МИК) и неомицина (7,5-кратное увеличение МИК). Таким образом, идентифицированный нами фермент AAC(2')-If, индуцируемый в клетках *E. coli*, активен *in vivo* и эффективно защищает клетки от данных антибиотиков.

Таким образом, оба исследования показывают, что идентифицированный нами у *S. rimosus* ATCC 10970 фермент AAC(2')-If придает бактериям устойчивость к АГ: гентамицину, тобрамицину, неомицину, паромомицину и сизомицину, и не оказывает влияния на устойчивость к канамицину и стрептомицину.

На основании полученных результатов мы можем предполагать, что гентамицин, тобрамицин, неомицин, паромомицин и сизомицин являются субстратами для идентифицированного нами фермента AAC(2')-If.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате предыдущих исследований нами выявлены 3 фермента АРН (АРН(3')-VIII, АРН(3")-Id и AphSR2), обуславливающих устой-

чивость к АГ: канамицину, неомицину, паромомицину, стрептомицину и гигромицину В. Однако ранее было показано, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 устойчив ко всем природным АГ. В связи с этим фактом было сделано предположение, что устойчивость к АГ у данного штамма может быть обусловлена не только АРН, но и другими ферментами, такими как ААС.

Анализ генома *S. rimosus* ATCC 10970 [14] позволил нам выявить 13 генов, кодирующих N-ацетитрансферазы семейства GNAT, содержащих домены «NAT_SF» и сайты связывания с коэнзимом А. На основании сходства аминокислотных последовательностей выявленных N-ацетитрансфераз с последовательностями описанных ранее аминогликозидацетилтрансфераз только одна из них была отнесена к известному подсемейству AAC(2').

Ферменты подсемейства AAC(2') ранее были идентифицированы в хромосоме условно-патогенной бактерии *P. stuartii* и у микобактерий [25–27]. Множественное выравнивание последовательностей показало, что AAC(2')-Sг содержит все консервативные аминокислоты, характерные для последовательностей ферментов подсемейства AAC(2') [28], поэтому мы обозначили этот фермент как AAC(2')-If. Мы клонировали ген *aac(2')-If* в *E. coli*. Оценка устойчивости к АГ показала, что индукция синтеза фермента AAC(2')-If обуславливает устойчивость *E. coli* к широкому спектру природных АГ: неомицину, гентамицину, тобрамицину, сизомицину и паромомицину, что согласуется с биоинформатическим анализом, согласно которому данный фермент отнесен к подсемейству AAC(2').

Происхождение ААС можно проследить до видов микробов из окружающей среды, представляющих собой обширный резервуар для новых и появляющихся ферментов резистентности, которые в настоящее время недостаточно изучены. Индукция синтеза ферментов, модифицирующих АГ, представляет собой стратегию выживания устойчивых к антибиотикам бактерий. ААС относятся к moonlighting-белкам, т.е. проявляют полифункциональные свойства. Так, у микобактерий ААС вносят частичный вклад в устойчивость к АГ и могут выполнять другие функции, в частности, способствовать ацетилированию белков клеточной стенки и пептидогликана, что объясняет широкую субстратную специфичность ААС-ферментов [26].

Впервые понятие «резистом» было введено D'Costa et al. [29] в 2006 г. при исследовании генов устойчивости к антибиотикам почвенных

бактерий рода *Streptomyces* – продуцентов большинства антибиотиков. Значительно ранее один из авторов данной статьи проводил исследования распространения и механизмов устойчивости к антибиотикам среди коллекции различных видов актинобактерий рода *Streptomyces* [30]. Штамм *S. rimosus* ATCC 10970 (продуцент окситетрациклина) обратил на себя внимание как яркий представитель, обладающий тотальной устойчивостью ко всем природным АГ [31]. В то время активно обсуждалась гипотеза происхождения и эволюции генов устойчивости к антибиотикам, обобщенная в более поздней работе Davies и Davies [32].

Позднее понятие «резистом» стали использовать для характеристики микробиомов различных экологических систем: почв, водных резервуаров, воздуха, растений, сельскохозяйственных животных, продуктов питания и человека. Резистом кишечника человека представляется наиболее уязвимым для здоровья источником генов лекарственной устойчивости [33, 34].

Известно, что гены устойчивости к антибиотикам легко передаются между группами бактерий различных микробиомов с помощью мобильных генетических элементов и других систем переноса генетического материала, включая внеклеточные везикулы [2, 35, 36].

В представленной работе в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 нами идентифицирован новый ААС-фермент, имеющий сходство с микобактериальными ферментами, относящимися к подсемейству ААС(2'). При этом важные вопросы взаимодействия резистомов между собой, приводящие к горизонтальному переносу генов антибиотикоустойчивости, требуют дальнейших исследований. Обмен генами устойчивости к антибиотикам между почвенными бактериями и клиническими патогенами возможен путем прямого обмена между почвенными микробами и патогенами человека или путем не прямой передачи через микробиоту кишечника человека, что подчеркивает клиническое значение почвенного резистома [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая данные, полученные авторами в ранее опубликованных [9–13] и представленной работах, нами в штамме *S. rimosus* ATCC 10970, не являющемся продуцентом АГ, идентифицировано 3 фермента АРН и фермент ААС(2')-If, обуславливающие устойчивость штамма ко всем природным АГ.

Представленные исследования открывают новые возможности для изучения распространения и особенностей экспрессии генов, определяющих природную устойчивость к АГ у актинобактерии рода *Streptomyces*.

В рамках дальнейшей работы предполагается выделение рекомбинантного белка ААС(2')-If, получение пространственных структур для выявления каталитически важных структурных мотивов, сравнительный анализ полученных пространственных структур с известными структурами аминокликозидацилтрансфераз других видов бактерий (в том числе патогенных).

Вклад авторов. В.Н. Даниленко – концепция и руководство работой; М.Г. Алексеева и Н.Н. Рудакова – проведение экспериментов; М.Г. Алексеева, А.В. Ратькин и Д.А. Мавлетова – обсуждение результатов исследования; М.Г. Алексеева – написание текста; Д.А. Мавлетова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0092-2022-003; тема «Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека»: «Микробиом кишечника человека: иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал», подтема «Распространение и функции генов аминокликозид ацетилтрансфераз в микробиоме почв и человека».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., and Blair, J. M. A. (2022) Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited, *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 280-295, doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.
2. Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., and Dantas, G. (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens, *Science*, **337**, 1107-1111, doi: 10.1126/science.1220761.
3. Surette, M. D., and Wright, G. D. (2017) Lessons from the environmental antibiotic resistome, *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 309-329, doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093420.

4. Ogawara, H. (2019) Comparison of antibiotic resistance mechanisms in antibiotic-producing and pathogenic bacteria, *Molecules*, **24**, 3430, doi: 10.3390/molecules24193430.
5. Ramirez, M. S., and Tolmasky, M. E. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes, *Drug. Resist. Updat.*, **13**, 151-171, doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
6. Hotta, K. (2021) Basic and applied research on multiple aminoglycoside antibiotic resistance of actinomycetes: an old-timer's recollection, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, kuab059, doi: 10.1093/jimb/kuab059.
7. Heinzl, P., Werbitzky, O., Distler, J., and Piepersberg, W. (1988) A second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3"-phosphotransferase. Relationships between antibiotic and protein kinases, *Arch. Microbiol.*, **150**, 184-192, doi: 10.1007/BF00425160.
8. Perry, J. A., Westman, E. L., and Wright, G. D. (2014) The antibiotic resistome: what's new? *Curr. Opin. Microbiol.*, **21**, 45-50, doi: 10.1016/j.mib.2014.09.002.
9. Елизаров С. М., Алексеева М. Г., Новиков Ф. Н., Чилов Г. Г., Маслов Д. А., Штиль А. А., Даниленко В. Н. (2012) Идентификация сайтов фосфорилирования аминогликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus*, *Биохимия*, **77**, 1504-1512.
10. Boyko, K. M., Gorbacheva, M. A., Korzhenevskiy, D. A., Alekseeva, M. G., Mavletova, D. A., Zakharevich, N. V., Elizarov, S. M., Rudakova, N. N., Danilenko, V. N., and Popov, V. O. (2016) Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **477**, 595-601, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.097.
11. Алексеева М. Г., Рудакова Н. Н., Захаревич Н. В., Мавлетова Д. А., Бойко К. М., Николаева А. Ю., Корженевский Д. А., Даниленко В. Н. (2018) Новый ген аминогликозидфосфотрансферазы *aph(3'')*-Id из *Streptomyces rimosus* ATCC10970, кодирующий устойчивость к стрептомицину, *Генетика*, **54**, 1228-1232, doi: 10.1134/S001667581810003X.
12. Alekseeva, M. G., Boyko, K. M., Nikolaeva, A. Y., Mavletova, D. A., Rudakova, N. N., Zakharevich, N. V., Korzhenevskiy, D. A., Ziganshin, R. H., Popov, V. O., and Danilenko, V. N. (2019) Identification, functional and structural characterization of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(3'')-Id from *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, *Arch. Biochem. Biophys.*, **671**, 111-122, doi: 10.1016/j.abb.2019.06.008.
13. Рудакова Н. Н., Алексеева М. Г., Захаревич Н. В., Мавлетова Д. А., Даниленко В. Н. (2020) Аминогликозидфосфотрансфераза AphSR2 *Streptomyces rimosus* ATCC 10970: зависимость устойчивости к антибиотикам от серин-треониновых протеинкиназ PkSR1 и PkSR2, *Генетика*, **56**, 119-124.
14. Algora-Gallardo, L., Schniete, J. K., Mark, D. R., Hunter, I. S., and Herron, P. R. (2021) Bilateral symmetry of linear streptomycete chromosomes, *Microb. Genom.*, **7**, 000692, doi: 10.1099/mgen.0.000692.
15. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, **96**, 23-28, doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.
16. Mierendorf, R., Yeager, K., and Novy, R. (1994) Innovations, *Newslett. Novagen*, **1**, 1-3.
17. Bolanos-Garcia, V. M., and Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1304-1313, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.027.
18. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich UK, 613 pp.
19. Sambrook, J., Fritsch, E. E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 479 pp.
20. Barry, A. L., and Thornsberry, C. (1993) *Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures* (Murray, P., ed.) Washington D.C, ASM Press, pp. 112-137.
21. Wiekler, M. A. (2015) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
22. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Milburn, D., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1998) Sequences annotated by structure: a tool to facilitate the use of structural information in sequence analysis, *Protein Eng.*, **11**, 855-859, doi: 10.1093/protein/11.10.855.
24. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948, doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
25. Hegde, S. S., Javid-Majd, F., and Blanchard, J. S. (2001) Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 45876-45881, doi: 10.1074/jbc.M108810200.
26. Sanz-García, F., Anoz-Carbonell, E., Pérez-Herrán, E., Martín, C., Lucía, A., Rodrigues, L., and Aínsa, J. A. (2019) Mycobacterial aminoglycoside acetyltransferases: a little of drug resistance, and a lot of other roles, *Front. Microbiol.*, **10**, 46, doi: 10.3389/fmicb.2019.00046.

27. Bassenden, A. V., Dumalo, L., Park, J., Blanchet, J., Maiti, K., Arya, D. P., and Berghuis, A. M. (2021) Structural and phylogenetic analyses of resistance to next-generation aminoglycosides conferred by AAC(2') enzymes, *Sci. Rep.*, **11**, 11614, doi: 10.1038/s41598-021-89446-3.
28. Aínsa, J. A., Pérez, E., Pelicic, V., Berthet, F. X., Gicquel, B., and Martín, C. (1997) Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*, *Mol. Microbiol.*, **24**, 431-441, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.3471717.x.
29. D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006) Sampling the antibiotic resistome, *Science*, **311**, 374-377, doi: 10.1126/science.1120800.
30. Даниленко В. Н., Пузынина Г. Г., Ломовская Н. Д. (1977) Множественная антибиотикорезистентность актиномицетов, *Генетика*, **13**, 1831-1842.
31. Потехин И. А., Даниленко В. Н. (1985) Детерминант устойчивости к канамицину *Streptomyces rimosus*: амплификация в составе хромосомы и обратимая генетическая нестабильность, *Молекулярная биология*, **19**, 805-817.
32. Davies, J., and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74**, 417-433, doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
33. Crits-Christoph, A., Hallowell, H. A., Koutouvalis, K., and Suez, J. (2022) Good microbes, bad genes? The dissemination of antimicrobial resistance in the human microbiome, *Gut Microbes*, **14**, 2055944, doi: 10.1080/19490976.2022.2055944.
34. Lee, K., Raguideau, S., Sirén, K., Asnicar, F., Cumbo, F., Hildebrand, F., Segata, N., Cha, C. J., and Quince, C. (2023) Population-level impacts of antibiotic usage on the human gut microbiome, *Nat. Commun.*, **14**, 1191, doi: 10.1038/s41467-023-36633-7.
35. Ellabaan, M. M. H., Munck, C., Porse, A., Imamovic, L., and Sommer, M. O. A. (2021) Forecasting the dissemination of antibiotic resistance genes across bacterial genomes, *Nat. Commun.*, **12**, 2435, doi: 10.1038/s41467-021-22757-1.
36. MacNair, C. R., and Tan, M. W. (2023) The role of bacterial membrane vesicles in antibiotic resistance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1519**, 63-73, doi: 10.1111/nyas.14932.
37. Jeong, C. S., Hwang, J., Do, H., Cha, S. S., Oh, T. J., Kim, H. J., Park, H. H., and Lee, J. H. (2020) Structural and biochemical analyses of an aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*, *Sci. Rep.*, **10**, 21503, doi: 10.1038/s41598-020-78699-z.

RESISTOM *Streptomyces rimosus* – A RESERVOIR OF RESISTANCE GENES TO AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS

M. G. Alekseeva*, N. N. Rudakova, A. V. Ratkin, D. A. Mavletova, and V. N. Danilenko

*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: alekseevamg@mail.ru*

The study of aminoglycoside acetyltransferases in actinobacteria of the genus *Streptomyces* is an integral part of the study of soil bacteria as the main reservoir and possible source of drug resistance genes. Previously, in the strain *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 (producing oxytetracycline), which is resistant to most natural aminoglycoside antibiotics, we have identified and biochemically characterized 3 aminoglycoside phosphotransferases, which cause resistance to kanamycin, neomycin, paromomycin, streptomycin, and hygromycin B. In the presented work, it was shown that resistance to other AGs in this strain is associated with the presence of the enzyme aminoglycoside acetyltransferase, belonging to the AAC(2') subfamily. Induction of the expression of the gene, designated by us as *aac(2')-If*, in *Escherichia coli* cells determines resistance to a wide range of natural aminoglycoside antibiotics (neomycin, gentamicin, tobramycin, sisomicin, and paromomycin) and to an increase in the minimum inhibitory concentrations of these antibiotics.

Keywords: multidrug resistance, *Streptomyces rimosus*, aminoglycoside acetyltransferase, MICs for aminoglycoside antibiotics