

АМИНОГЛИКОЗИДФОСФОТРАНСФЕРАЗА AphSR2 *Streptomyces rimosus* ATCC 10970: ЗАВИСИМОСТЬ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ОТ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ PkSR1 И PkSR2

© 2020 г. Н. Н. Рудакова¹*, М. Г. Алексеева¹, Н. В. Захаревич¹,
Д. А. Мавлетова¹, В. Н. Даниленко¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: natachka92@mail.ru

Поступила в редакцию 10.04.2019 г.

После доработки 10.06.2019 г.

Принята к публикации 12.06.2019 г.

При секвенировании в геноме штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 было аннотировано 14 генов аминогликозидфосфотрансфераз: *aphSR1–aphSR14*. Ранее нами было показано, что гены *aphVIII* (*aphSR5*) и *aph(3')-Id* (*aphSR3*) при клонировании в *E. coli* обуславливают устойчивость к канамицину, неомицину, паромомицину и стрептомицину. Установлено, что устойчивость к антибиотикам AphVIII повышается после фосфорилирования по сайту Ser146 в активационной петле фермента серин-треониновыми протеинкиназами (СТПК). При клонировании гена *aphSR2* в *E. coli* показано, что он обуславливает устойчивость к неомицину и гиромомицину. В представленной работе исследовали влияние генов СТПК на повышение устойчивости *E. coli* к аминогликозидным антибиотикам при совместном клонировании гена *aphSR2* и генов СТПК (*pkSR1* и *pkSR2*), локализованных в одном кластере генома *S. rimosus* ATCC 10970. Установлено, что в совместной конструкции *E. coli/aphSR2/pkSR1* происходит повышение уровня устойчивости к неомицину в 2 раза. Представленные данные являются вторым примером влияния СТПК на модуляцию уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам у бактерий рода *Streptomyces*.

Ключевые слова: *Streptomyces rimosus*, ген аминогликозидфосфотрансферазы (*aph*), серин-треониновые протеинкиназы (СТПК), спектр и уровень устойчивости к антибиотикам.

DOI: 10.31857/S0016675820010099

Способность микроорганизмов развивать устойчивость к действию антибиотиков известна с момента открытия противомикробных агентов [1]. В последние десятилетия сформировано понятие “резистом”, включающее совокупность генов устойчивости, характерную для конкретного бактериального сообщества. По данным Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) в настоящее время насчитывается 23137 генов устойчивости. Ингибирование генов устойчивости делает возможным использование существующих антибиотиков против резистентных бактерий [2].

Впервые устойчивость бактерий к аминогликозидным антибиотикам выявлена в 1952 г. В начале 70-х гг. была выдвинута гипотеза о происхождении генов лекарственной устойчивости, в частности аминогликозидфосфотрансфераз, из почвенных микроорганизмов – продуцентов антибиотиков [3]. В 1983 г. были идентифицированы и секвенированы гены аминогликозид-3'-фосфотрансфераз на плазмидах и мобильных элементах у клинических штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий [4].

Известно, что гены устойчивости к антибиотикам гипотетически берут начало в бактериях – продуцентах антибиотиков, относящихся к роду *Streptomyces*. При аннотации геномов у актинобактерий выявлено от 4 до 14 генов аминогликозидфосфотрансфераз. Однако функции генов, аннотированных как *aph* в секвенированных геномах (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), в настоящее время недостаточно изучены [5].

При секвенировании в геноме штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (продуценте окситетрацилина) [6] идентифицировано 14 генов, аннотированных как *aph*, которым нами были присвоены названия *aphSR1–aphSR14*. Нами был проведен сравнительный и филогенетический анализ аминокислотных последовательностей продуктов 14 *aph*-генов с известными ранее *aph*-генами из клинических изолятов и штаммов-продуцентов аминогликозидных антибиотиков, относящихся к семи подсемействам. По результатам проведенного анализа AphSR5 (AphVIII) относится к подсемейству Aph(3'), AphSR3 – к подсемейству

Aph(3"), а AphSR2 расположена на одной ветви с Aph(7")-Ia.

Ранее нами в штамме *S. rimosus* ATCC 10970 с высоким уровнем устойчивости к аминогликозидам были идентифицированы и охарактеризованы две аминогликозидфосфотрансферазы. AphSR5 (Aph(3')-VIII) обуславливает устойчивость к канамицину, неомицину и паромомицину; важной особенностью AphVIII *S. rimosus* является зависимость активности фермента от уровня его фосфорилирования серин-треониновыми протеинкиназами; получена 3D-структура AphVIII (код PDB 4H05) [7–10]. При клонировании гена *aphSR3* (*aph(3")-Id*) в *E. coli* установлено, что он обуславливает устойчивость к стрептомицину [11].

Объектом данного исследования является аминогликозидфосфотрансфераза AphSR2. Согласно проведенному филогенетическому анализу, AphSR2 расположена на одной ветви с Aph(7")-Ia, но бутстреп-поддержка соответствующего узла дерева невелика (<60%), тем не менее предоставляется возможным отнести их к подсемейству Aph(7"). Вместе с этим сравнительный анализ AphSR2, при помощи программы SAS (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>), с известными 3D-структурами показал сходство AphSR2 с 3D-структурой трансферазы Rv3168 (PDB ID – 3ATS) штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (процент идентичности 31.2%).

Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей, проведенный по программе Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), показал, что последовательность AphSR2 имеет значительно больше общих консервативных аминокислотных остатков с последовательностью Rv3168, чем с аминогликозидфосфотрансферазой Aph(7")-Ia (рис. 1,а).

С использованием баз данных NCBI и UniProt (<http://www.uniprot.org/>) установлено, что ген *aphSR2* расположен в одном кластере с генами двух серин-треониновых протеинкиназ (СТПК), которым нами были присвоены следующие названия (по номерам локусов генов): SRIM_07563 – *pkSR1*, SRIM_07568 – *pkSR2*. Транскрипция гена *pkSR1* происходит в том же направлении, как и гена *aphSR2*, рис. 1,б.

Ранее нами была проведена классификация СТПК грамположительных бактерий, в основу ее лег анализ сигнатуры из девяти вариативных аминокислотных остатков, боковые цепи которых экспонированы в область связывания аденина. По итогам классификации все СТПК были разделены на 20 групп. По предложенной классификации СТПК, PkSR1 относится к группе IIa, а PkSR2 – к группе IIb [12, 13]. Ортологами данных СТПК являются киназы *Streptomyces coelicolor* Pk13 (идентичность по программе BLAST 89%) и Pk12 (идентичность по программе BLAST 93%) соответственно [14]. Обсуждаемые киназы *S. coelicolor* расположены на хромосоме так же, как и киназы *S. rimosus* – рядом, но направлены в раз-

ные стороны. Ни одна из 11 описанных и хорошо изученных СТПК *M. tuberculosis* не является ортологом рассматриваемых СТПК *S. rimosus*.

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

Белок PkSR1 состоит из 573 аминокислотных остатков, доменная структура белка представлена каталитическим доменом (19–288 а/к) и PASTA доменом (503–569 а/к). Белок PkSR2 состоит из 516 аминокислотных остатков, доменная структура белка представлена каталитическим доменом (5–265 а/к).

На первом этапе проводили клонирование каталитических доменов протеинкиназ в *E. coli*. Амплификацию генов *pkSR1* и *pkSR2* осуществляли с геномной ДНК штамма *S. rimosus* методом ПЦР (набор ПСК-100 фирмы "Dialat Ltd." на приборе РТС-0150 (MJ Research, Inc.)) с использованием олигонуклеотидов PkSR1-N (5'-tcgcggatcccgtac-cagctccctgatct-3') и PkSR1-C (5'-tcgcggatcccgtac-cggctcacgcgccc-3') для гена *pkSR1* и олигонуклеотидов PkSR2-N (5'-tcgcggatcccgtaccggctcacgcgccc-3') и PkSR2-C для гена *pkSR2* (5'-ccgcaagcttgcgcatctcctc-cgctgctg-3'). Полученные фрагменты клонировали по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Hind*III в экспрессионный вектор pET28a (селективный маркер Km). Затем полученные гибридные плазмиды pET28a:*pkSR1* и 28a:*pkSR2* обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Xho*I и встраивали по указанным сайтам рестрикции в экспрессионный вектор pET32a (селективный маркер ампициллин). В результате клонирования получены гибридные плазмиды pET32aM:*pkSR1* и pET32aM:*pkSR2*.

Затем проводили клонирование гена *aphSR2* в плазмиды pET32aM:*pkSR1* и pET32aM:*pkSR2* по сайту эндонуклеазы рестрикции *Xba*I. Для контроля было проведено клонирование гена *aphSR2* в плазмиду pET32a по сайту эндонуклеазы рестрикции *Xba*I. Амплификацию гена *aphSR2* проводили с плазмидной ДНК pET16b:*aphSR2* с использованием олигонуклеотидов T7prom (5'-ttaatcagactcactatagg-3') и AphSR2C-*Xba*I (5'-agcctctagatcactccgtgaagccgccc-3'). Скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов T7prom и AphC-*Xba*I, что позволяло отбирать клоны с требуемой ориентацией. Полученные плазмиды обозначены pET32aM:*aphSR2/pkSR1*, pET32aM:*aphSR2/pkSR2* и pET32a:*aphSR2*.

Для изучения экспрессии генов *aphSR2*, *pkSR1* и *pkSR2* в *E. coli* полученными гибридными плазмидами трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) (F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), gal λ (DE3)) (Novagen) и выращивали в жидкой среде LB при 37°C до оптической плотности

a

AphSR2	MLR-----SSDVRTAAPPDGHITLGSLLRRY----GAGEPLSCVPVAEGLLNHGYRLATTH	51
APH(7 ^{''})-Ia	-----MTQ	3
Rv3168	MANEPAIGAI DRLQRSSRDVTTLPAVISRWLSSVLPGGAAPEVTVESGVDSTGMSSET--	58
AphSR2	GRYFLKHHLDGDQAAI-----ARQHRATRRLGALGLPVAPPLADADG-----	93
APH(7 ^{''})-Ia	ESLLLLLDRI DSDSYASLRNDQEFWEPLARRALEELGLPVPPVLRVPGESTNPNVLVGE PD	63
Rv3168	--IILTARWQQDGRSI-----QQKLVARVAPAAEDVPVFPPTYRLDHQFEVIRLVGEL-	108
	:* : : *	
	: *	
	. : ** *	
AphSR2	-----RTVTVLGG-----RCYALHPWVE	111
APH(7 ^{''})-Ia	PVIKLFGEHWCGPESLASESEAYAVLADAPVVPVRLLRGELRPGTGAWPWPYLVMSS---	120
Rv3168	-----TDVPVPRVRWIETTGDVLGT-----PEFLMDYVE	137
	*	
	:	
AphSR2	GRHRDGA-----ALTRHQSRCLGALLGQVHTALEQVITPDTAGPGVPYEHAGA	159
APH(7 ^{''})-Ia	-----RMTGTTWRSAMDGTTDRNALLALARELGRVLRGRVPLTGNVTLPVHSEV	171
Rv3168	GVVPPDVMPTFQDNWFADAPAERQRLQDATV----AALATLHSIPNAQNTFSFLTQGR	193
	: . *	
	* :	
	* :	
	* :	
	* :	
AphSR2	D---PAR---TFEMIDELLALARRSRPRSSFDELAEHRLLERRALLEREARRRPGADRV	212
APH(7 ^{''})-Ia	FPELLRERRAATVEDHRGW-----GYLSPRLDRLEDWLPDVT-LLAGRE	216
Rv3168	TSDTTLHR---HFNWVRSWYDFA-----VEGIGRSPLLERTFEWLQSHWPDDAARE	242
	*	
	:	
	** :	
	** :	
	** :	
	** :	
	** :	
	** :	
AphSR2	PATGWHVHGDHFPLNLLYRDA--EPAATVDWDRLLAVQPRAEAVRAA--AIFEVQPA-GTL	267
APH(7 ^{''})-Ia	PR--FVHGDHLGHTNIFVDLAATEVTGIVDFTDVYAGDSRYSLSVQLHLN--AFRGDREILA	272
Rv3168	PV--LLWGDARVGNVLYRDF--QPVAVLWDWEMVALGPRELDVAWMI FAHRVFEQLA-GLA	297
	* : ** :	
	* : :	
	* : :	
	* : :	
	* : :	
	* : :	
	* : :	
	* : :	
	* : :	
AphSR2	DLPKVGAY-----AGAYRRASGAGAAELAAAVHRVWVERL-NDFWMLDWRYRLGDRRAD	320
APH(7 ^{''})-Ia	ALLDGAQWKRTEDFA-----RELLAFTFLHDFEVFE-----ETPLD	308
Rv3168	TLPGLPEVMREDDVRATYQALTGVELGDL-----HWFYVYSGVMWACVF-MRTGARVH	350
	*	
	:	
	*	
	:	
AphSR2	P---QFPAAAALAVVWWTREYGAVRAAFTE--	346
APH(7 ^{''})-Ia	LSGFTDPEELAQLFLWGPPDTAP-----GA--	332
Rv3168	FGEIEKPDVV-ESLFYH--AGLMKHLLEEH	378
	*	
	:	
	:	

Рис. 1. Характеристика кластера генов *aphSR2* и *pkSR1*, *pkSR2* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 и кодируемых ими белков. *a* – сравнение аминокислотной последовательности AphSR2 с последовательностями APH(7^{''})-Ia и Rv3168 (остатки консервативные между всеми тремя последовательностями выделены черным цветом, между двумя – серым); *b* – транскрипционная организация кластера генов *aphSR2* и *pkSR1*, *pkSR2* штамма *S. rimosus* ATCC 10970 (*hp* – hypothetical protein, *citB* – putative two-component system response transcriptional regulator, *pdha1* – pyruvate dehydrogenase E1); *в* – электрофорез растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего плазмиды: 1 – pET32a, 2 – pET32a:*aphSR2*; 3 – pET32a:*pkSR1*, 4 – pET32a:*aphSR2* + *pkSR1*, 5 – pET32a:*pkSR2*, 6 – pET32a:*aphSR2* + *pkSR2*. М – маркер молекулярной массы белков SM0441 (Fermentas, Литва).

0.6 (~2 ч), затем индуцировали экспрессию добавлением изопропил-β-D-тиогаляктозида (ИПТГ) до финальной концентрации 1.3 мМ. Далее проводили культивирование при 28°C в течение 18 ч, клетки осаждали центрифугированием (5000 об./мин, 10 мин, 4°C) и суспендировали в Sample буфера и анализировали с помощью SDS-электрофореза в 12.5%-ном ПААГ по методу Лэммли. В качестве

контроля использовали фракции белков штаммов *E. coli*, содержащих плазмиду pET32a без вставки. Анализ электрофореграммы показал экспрессию белков с молекулярными массами 33, 32 и 41 кДа, что соответствует расчетным молекулярным массам белков каталитических доменов протеинкиназ PkSR1 и PkSR2 и массе белка AphSR2, рис. 1,в.

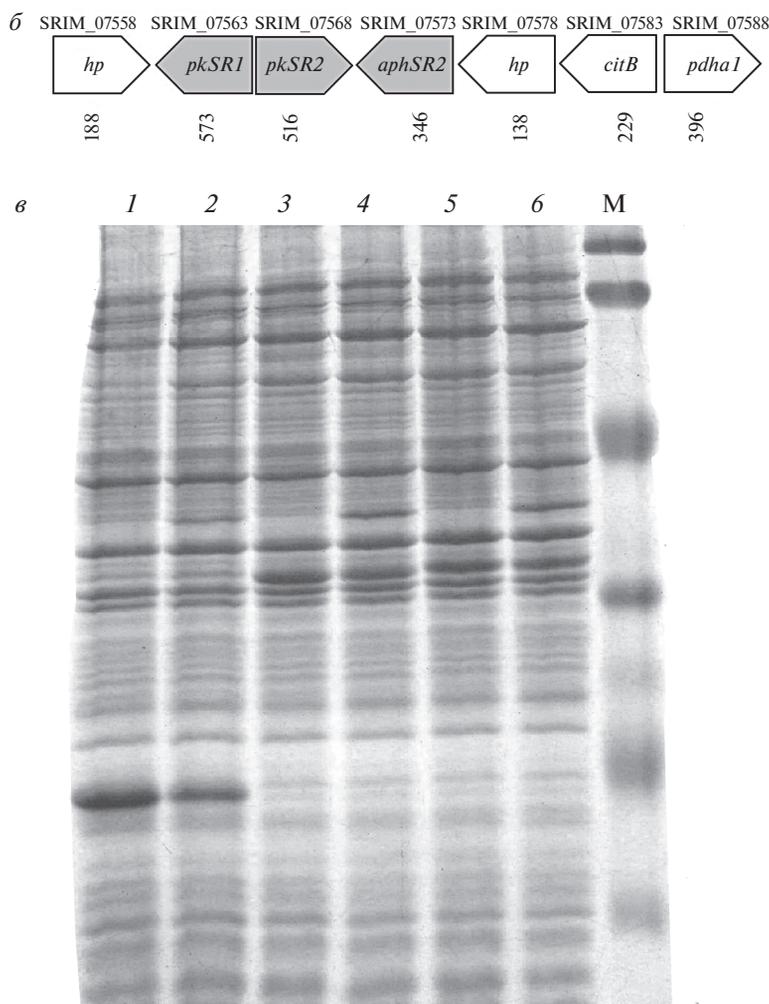


Рис. 1. Окончание.

На следующем этапе работы проводили тестирование спектра устойчивости к аминогликозидным антибиотикам методом стандартных дисков штаммов *E. coli* BL21(DE3), содержащих все полученные рекомбинантные плазмиды. Тестирование спектра устойчивости проводилось с использованием бумажных дисков с аминогликозидными антибиотиками: канамицином (30 мкг/диск), неомицином (30 мкг/диск), амикацином (30 мкг/диск), стрептомицином (10 мкг/диск), гентамицином (10 мкг/диск), тобрамицином (10 мкг/диск), сизомицином (10 мкг/диск), нетилмицином (10 мкг/диск), изепамицином (30 мкг/диск) и гигромицином (100 мкг/диск). Учет результатов проводили после инкубирования в течение 16–18 ч при 37°C.

Проведенные исследования по определению зоны подавления роста вокруг бумажных дисков показали, что ген *aphSR2* обуславливает устойчивость *E. coli* BL21(DE3) к неомицину и гигромицину (табл. 1). В случае совмещения генов *aphSR2* и *pkSR1* в одном векторе уровень устойчивости *E. coli* к неомицину увеличивался, а в случае сов-

мещения генов *aphSR2* и *pkSR2* не изменялся. Совмещение генов *aphSR2* и СТПК (*pkSR1* или *pkSR2*) не оказывало влияния на устойчивость к гигромицину. В качестве контроля были проведены исследования по влиянию генов СТПК на устойчивость *E. coli* BL21(DE3), данные гены не оказывали влияния на устойчивость к неомицину, но повышали чувствительность к гигромицину. Эти результаты позволяют предположить, что ген *aphSR2* может быть кандидатом устойчивости к гигромицину у *S. rimosus*. Согласно литературным данным, *aph(7'')-Ia* обуславливает устойчивость к гигромицину В [15], а *rv3168* – к канамицину [16]. В отличие от *rv3168* и *aph(7'')-Ia*, *aphSR2* показал влияние на устойчивость клеток *E. coli* к неомицину и гигромицину.

Далее проводили тестирование уровня устойчивости к неомицину и гигромицину методом анализа минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Для анализа использовали клоны трансформантов *E. coli* BL21(DE3), содержащих рекомбинантные плазмиды pET32a, pET32a:*aphSR2* и

Таблица 1. Изменение уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам при совместной экспрессии в *E. coli* BL21(DE3) генов *aphSR2*, *pkSR1* и *pkSR2*

Проверяемый антибиотик*	Исследуемые конструкции						
	BL21(DE3)	BL21(DE3) pET32a	BL21(DE3) pET32a: <i>aphSR2</i>	BL21(DE3) pET32a: <i>aphSR2</i> + <i>pkSR1</i>	BL21(DE3) pET32a: <i>pkSR1</i>	BL21(DE3) pET32a: <i>aphSR2</i> + <i>pkSR2</i>	BL21(DE3) pET32a: <i>pkSR2</i>
Неомицин (30 мкг/диск)	19 ± 0.61	19 ± 0.47	16 ± 0.59	12.5 ± 0.71	19 ± 0.61	16 ± 0.54	19 ± 0.55
Канамицин (30 мкг/диск)	21 ± 0.50	21 ± 0.55	21 ± 0.80	21 ± 0.56	21 ± 0.51	21 ± 0.55	21 ± 0.73
Гигромицин (100 мкг/диск)	15 ± 0.53	15 ± 0.59	12 ± 0.47	14 ± 0.44	17 ± 0.55	16.5 ± 0.58	18 ± 0.53

Примечание. Приведены усредненные результаты трех независимых измерений, данные представлены в виде: среднее значение ± σ (сигма, среднее отклонение). Достоверность различий между выборками оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Уровень значимости отличий между выборками составлял 0.05 (программа Statistica v6).

* Чувствительность к антибиотикам, исследованная методом наложения дисков.

pET32aM:*aphSR2/pkSR1*. Отдельные колонии собирали и переносили в пробирки, содержащие 2 мл бульона LB, после чего выращивали ночную культуру до оптической плотности $OD_{625} = 0.3$, а затем разбавляли средой LB, получая конечную плотность 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. К каждой из серии пробирок, содержащих двукратные разведения неомицина в 2 мл среды LB, добавляли 100 мкл культуры клеток (ИПТГ, 100 мкМ), чтобы индуцировать экспрессию генов *aphSR2* и *pkSR1*. После инкубации культур при комнатной температуре (~25°C) и 250 об./мин в течение 18 ч значения МИК (минимальная ингибирующая концентрация) определяли как самую низкую концентрацию неомицина или гигромицина, которая приводила к полному ингибированию роста (что определялось спектрофотометрически при OD_{625}).

В экспериментах по определению МИК методом серийных разведений, для контрольного штамма *E. coli* BL21(DE3) концентрация неомицина составляла 8 мкг/мл; индукция экспрессии рекомбинантного белка увеличивала МИК до 16 мкг/мл, совместная экспрессия генов *pkSR1* и *aphSR2* обуславливает повышение МИК до 32 мкг/мл. Таким образом, было установлено, что при совместном клонировании в *E. coli* *aphSR2* обуславливает устойчивость к неомицину, которая моделируется *pkSR1*. МИК гигромицина для контрольного штамма *E. coli* BL21(DE3) составляла 100 мкг/мл, это указывает на устойчивость штамма *E. coli* к гигромицину, что затрудняет измерение МИК [17].

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

Полученные результаты подтверждают выдвинутую гипотезу о роли сигнал-передающих систем почвенных бактерий в модуляции экспрессии генов устойчивости к антибиотикам у актинобактерий [18].

В рамках дальнейшей работы предполагаются выделение рекомбинантных белков AphSR2, PkSR1 и PkSR2, изучение *in vitro* уровня и сайтов фосфорилирования исследуемой аминогликозидфосфотрансферазы и влияния фосфорилирования на активность фермента.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01106 от 6 апреля 2017 г.) и в рамках Государственного задания “Генетические технологии в биологии, медицине, сельскохозяйственной и природохозяйственной деятельности” (№ 0112-2019-0002 2019 г.).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies J. Antibiotic resistance and the golden age of microbiology // Ups. J. Med. Sci. 2014. V. 119. № 2. P. 65–67. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.898718>
2. Gerard D., Wright G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. P. 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
3. Davies J. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics // J. Infect. Dis. 1971. V. 124. Suppl. S7–S10.

4. Wright G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance // Chem. Commun. (Camb.). 2011. V. 47. № 14. P. 4055–4061. <https://doi.org/10.1039/c0cc05111j>
5. Anderson A.S., Clark D.J., Gibbons P.H. et al. The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of actinomycetes // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 29. № 2. P. 60–69.
6. Pethick F.E., MacFadyen A.C., Tang Z. et al. Draft genome sequence of the oxytetracycline-producing bacterium *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 // Genome Announc. 2013. V. 1. № 2. P. e00063-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00063-13>
7. Сизова И.А., Хегеманн П., Фурманн М. и др. Аминогликозид-3'-фосфотрансфераза VIII из *Streptomyces rimosus*: сравнение с аминогликозид-3'-фосфотрансферазами из штаммов-продуцентов аминогликозидов и с эукариотическими протеинкиназами // Мол. биология. 2002. Т. 36. № 1. С. 18–25.
8. Елизаров С.М., Сергиенко О.В., Сизова И.А. и др. Зависимость активности аминогликозид-3'-фосфотрансферазы типа VIII от серин-треонинпротеинкиназ у *Streptomyces rimosus* // Мол. биология клетки. 2005. Т. 39. № 2. С. 1–9.
9. Елизаров С.М., Алексеева М.Г., Новиков Ф.Н. и др. Идентификация сайтов фосфорилирования аминогликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 11. С. 1504–1512. <https://doi.org/10.1134/S0006297912110041>
10. Boyko K.M., Gorbacheva M.A., Korzhenevskiy D.A. et al. Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016. V. 477. № 4. P. 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.097>
11. Алексеева М.Г., Рудакова Н.Н., Захаревич Н.В. и др. Новый ген аминогликозидфосфотрансферазы *aph(3'')-Id* из *Streptomyces rimosus* ATCC10970, кодирующий устойчивость к стрептомицину // Генетика. 2018. Т. 54. № 10. С. 1228–1232. <https://doi.org/10.1134/S001667581810003X>
12. Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., Artamonova I.I. et al. Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria // Proteins. 2012. V. 80. № 5. P. 1363–1376. <https://doi.org/10.1002/prot.24032>
13. Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Серин-треониновые протеинкиназы бактерий – потенциальная мишень для регуляции состава микробиоты человека // Вестн. РГМУ. 2017. № 2. С. 20–29.
14. Petricková K., Petricek M. Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme // Microbiology. 2003. V. 149. № 7. P. 1609–1621. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26275-0>
15. Berthold P., Schmitt R., Mages W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph 7''* gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii* // Protist. 2002. V. 153. № 4. P. 401–412. <https://doi.org/10.1078/14344610260450136>
16. Kim S., Nguyen C.M., Yeo S.J. et al. Cloning, expression, purification, crystallization and X-ray crystallographic analysis of Rv3168 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 2011. V. 67. № 5. P. 627–629. <https://doi.org/10.1107/S1744309111010487>
17. Rao R.N., Allen N.E., Hobbs J.N. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. 1983. V. 24. № 5. P. 689–695.
18. Danilenko V.N., Mironov V.A., Elizarov S.M. Calcium as a regulator of intracellular processes in actinomycetes: A review // Appl. Biochem. and Microbiol. 2005. V. 41. № 4. P. 319–329.

Aminoglycoside Phosphotransferase AphSR2 from *Streptomyces rimosus* ATCC 10970: Dependence of the Antibiotic Resistance from Serine-Threonine Protein Kinases PkSR1 and PkSR2

N. N. Rudakova^{a,*}, M. G. Alekseeva^a, N. V. Zakharevich^a, D. A. Mavletova^a, and V. N. Danilenko^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: natachka92@mail.ru

Streptomyces rimosus ATCC 10970 contains 14 genes annotated as aminoglycoside phosphotransferases in its genome: *aphSR1*–*aphSR14*. We have previously shown, that genes *aphVIII* (*aphSR5*) and *aph(3'')-Id* (*aphSR3*), when cloning at *E. coli*, cause resistance to kanamycin, neomycin, paromomycin and streptomycin, respectively. For Aph(3'')-VIII was found that antibiotic resistance increased after phosphorylation at Ser146 motif in active site of enzyme by serine-threonine protein kinases (STPK). The *aphSR2*, when cloning at *E. coli*, cause resistance to neomycin and hygromycin. At this work, we investigated the possibility of influence to increasing aminoglycoside antibiotics resistance when cloned into *E. coli* at pET32a both the *aphSR2* gene and STPK genes (*pkSR1* and *pkSR2*), localized in one cluster of the *S. rimosus* ATCC 10970 genome. We detected that in construction *E.coli/aphSR2/pkSR1* there is 2-fold increase of neomycin resistance. The presented data are the second example of the STPK effect on the modulation of the aminoglycoside antibiotics resistance level in bacteria of the genus *Streptomyces*.

Keywords: *Streptomyces rimosus*, aminoglycoside phosphotransferase (aph), serine-threonine protein kinase, spectrum and level of resistance to antibiotics.