

На правах рукописи

Баранова Анна Александровна

Метаболомное и геномное определение антибиотиков и механизмов антибиотикорезистентности

1.5.6 – БИОТЕХНОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Лаборатории антибиотикорезистентности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель: **Алфёрова Вера Александровна**, кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Митькевич Владимир Александрович**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН)

Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая Лабораторией Молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН

Защита состоится 24 сентября 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « » 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Большинство антибиотиков, используемых в клинической практике, имеют природное происхождение. Поиск новых биологически активных соединений из растений, микроорганизмов и других источников продолжает оставаться актуальным, ввиду развития антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов. Природные соединения послужили базовыми структурными скелетами и богатым источником вдохновения для разработки новых полусинтетических и синтетических антибиотиков, предлагая разнообразие структурных мотивов для новых механизмов действия и структурные модификации, которые могут затруднить бактериальную резистентность. Такие вещества можно использовать напрямую, модифицировать или комбинировать с существующими препаратами для повышения эффективности и потенциального увеличения антимикробной активности.

За последние годы был достигнут значительный прогресс в различных направлениях данной области: в определении химических свойств, необходимых для преодоления барьера проникновения препарата в граматрицательных патогенах; в расширении химического разнообразия синтетических молекул с антимикробной активностью; в поиске ранее «некультивируемых» бактерий или необычных бактерий. Новые стратегии поиска биологически активных соединений опираются на методы структурной биологии, геномики, молекулярной генетики, филогенетического анализа и искусственного интеллекта.

Цель работы и задачи исследования. Целью данной работы был поиск биологически активных соединений с помощью современных подходов метаболомики, геномики и микробиологии. Для достижения поставленной цели предполагалось решение следующих задач:

1. Поиск продуцентов антимикробных метаболитов из альтернативных местообитаний: донные отложения Белого моря, муравьи-древоточцы, слизистая носа свиньи.
2. Геномный поиск ингибиторов биосинтеза белка среди пуромицин-подобных биосинтетических генных кластеров актиномицет.
3. Метаболомный анализ штаммов-продуцентов и идентификация структуры антибиотиков, выделенных из донных отложений Белого моря, микробиоты слизистой носа свиньи, микробиоты муравьев-древоточцев и штамма-продуцента аналога пуромидина.

Научная новизна и практическая значимость работы. Поиск продуцентов антибиотиков ведется в основном путем скрининга микроорганизмов из различных природных источников. Большинство антибактериальных агентов происходит от хорошо известных наземных или водных изолятов актиномицет. Выделенные из альтернативных мест обитания микроорганизмы так же представляют собой большой интерес благодаря их адаптации к конкретным экологическим нишам за счет сложной биохимии и необычных путей метаболизма. Таким образом, поиск новых биологически активных молекул сместился в сторону морских экосистем, таксонов, обитающих в экстремальных условиях, ассоциированных с насекомыми, симбионтов млекопитающих и др. В рамках диссертационной работы впервые проведен поиск антимикробных метаболитов среди представителей морских местообитаний, выделенных из донных отложений Белого моря. Изучена противогрибковая активность штамма гриба *Tolypocladium inflatum* 13. Впервые проведено метаболомное исследование культивируемой фракции микробиоты слизистой носовой полости венгерской домашней свиньи. Исследование показало, что такая микробиота является потенциальным источником антимикробных соединений, а для ее дальнейшего изучения наиболее перспективны биотехнологические подходы, основанные на индукции биосинтеза вторичных метаболитов с помощью со-культивирования с патогенными тест-микроорганизмами: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Анализ микробиоты, ассоциированной с черными муравьями-древоточцами *Camponotus vagus*, позволил выделить штамм *Streptomyces* sp. A10, проявивший противогрибковые свойства в отношении энтомопатогенных грибов, особенно в отношении *Conidiobolus coronatus* и *Beauveria bassiana*.

Использование современных технологий высокопроизводительного секвенирования, а также геномного майнинга, позволяет проводить направленный поиск биосинтетических

аналогов антибиотиков. В данной работе был проведен поиск аналогов известного ингибитора биосинтеза белка – пурамицина. Геномный поиск последовательностей, сходных с PngB-подобным ферментом в биосинтетическом кластере пурамицина, позволил впервые выявить у различных видов *Streptomyces* панель кластеров, отличающуюся от пурамицинового другим паттерном метилирования. Метаболомное исследование одного из штаммов выявило продукцию антибиотика цистоцина. Анализ полной геномной последовательности штамма-продуцента цистоцина выявил наличие биосинтетического генного кластера, ответственного за синтез аминонуклеозидных соединений. Общая архитектура кластера цистоцина схожа с кластером пурамицина, однако цистоцин обладает менее выраженным антибиотическим действием, чем пурамицин. Было обнаружено, что в кластере цистоцина аналогичный пурамицину механизм собственной устойчивости, заключающийся в продукции антибиотика в неактивной N-ацилированной форме. В составе биосинтетического генного кластера цистоцина идентифицирована N-ацетилтрансфераза *cstC*, которая имеет значительное сходство с N-ацетилтрансферазой PAC пурамицина, которая инактивирует пурамицин путем N-ацилирования. Анализ на восприимчивость показал, что ферменты CstC, и PAC обеспечивают лишь частичную кроссрезистентность, обусловленную субстратной специфичностью ацетилтрансфераз. Это открытие может послужить основой для рационального конструирования ферментов селективной устойчивости с целью создания систем селекции, ортогональных системам на основе пурамицина.

В ходе метаболомного анализа штаммов-продуцентов был идентифицирован ряд анти-микробных веществ. Противогрибковая активность морского гриба *T. inflatum* 13 была связана с продукцией биоактивного метаболита циклоспорина А, известного как препарат-иммуносупрессор, используемый при трансплантации. Впервые определена продукция циклоспорина морским представителем *T. inflatum*. В ходе масс-спектрометрической идентификации циклоспорина было обнаружено образование примеси его изомера изоциклоспорина. Циклоспорин А способен превращаться в неактивный изоциклоспорин А путем N→O ацильного сдвига в паре аминокислот MeVal¹¹-MeBmt¹, поэтому важен контроль его присутствия в субстанции препарата циклоспорина А. В рамках диссертационной работы был разработан новый способ анализа циклоспоринов, в том числе идентификации циклоспорина А и его изомера изоциклоспорина А, заключающийся в масс-спектрометрическом различении изомеров циклических пептидов, содержащих β-гидроксид-N-метиламинокислоты. Подход заключается в регистрации масс-спектра с ионизацией распылением в электрическом поле с дальнейшим анализом фрагментации дважды протонированных ионов. Способ позволяет различить изомеры таких циклических пептидов за счет подавления характерного для них N→O-ацильного сдвига за счет протонирования β-гидроксильной группы. Антимикробная активность штамма *Pseudomonas aeruginosa* SM-11, выделенного из культивируемой фракции слизи носа венгерской домашней свиньи была связана с продукцией антибиотиков пиохелина, пиолитеорина, гликолипида RhaC10C10 и индуцированного культивированием с патогенным микробом пиоцианина. Выделенные противогрибковые вещества из штамма *Streptomyces* sp. A10, ассоциированного с муравьем, были идентифицированы как депсипептиды антимицинового типа, а именно антимицины A1-A20. В этой работе впервые показано, что антимицины могут быть ассоциированы помимо муравьев листорезов, также с черными муравьями-древоточцами, что позволяет предположить, что у муравьев разных видов высока физиологическая роль симбионтов. Было показано, что использование комплекса подходов, основанных на исследовании уникальных экологических ниш, метаболомных и геномных методов позволяет повысить эффективность поиска штаммов-продуцентов антибиотиков, а также идентификации антимикробных соединений.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработан новый подход к масс-спектрометрической идентификации циклоспоринов, основанный на различиях в фрагментации двухзарядных ионов изомерных циклических пептидов, содержащих β-гидроксид-N-метиламинокислоту MeBmt. Метод позволяет достоверно дифференцировать циклоспорин А и его изомер — изоциклоспорин А.

2. Впервые проведено метаболомное исследование культивируемой фракции назальной микробиоты венгерской домашней свиньи породы Мангалица. Показано, что назальная микробиота млекопитающих представляет существенный интерес в качестве источника продуцентов антимикробных соединений.

3. Впервые установлена продукция противогрибковых антибиотиков антимицинов стрептомицетами, ассоциированными с черными муравьями-древоточцами *Camponotus vagus*. Установлена противогрибковая активность антимицинов в отношении энтомопатогенных грибов. Филогенетический анализ штаммов, содержащих биосинтетические генные кластеры антимицинов и продуцирующих данные соединения, выявил кластер генетически близких штаммов. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной роли симбиотических актиномицетов в регуляции микробных сообществ в природных экосистемах.

4. С помощью геномного майнинга Puf6-подобных ферментов биосинтеза пуромицина найдены кластеры биосинтеза с другим паттерном метилирования. Установлена продукция пуромицин-подобного антибиотика цистоцина. Описан предполагаемый путь биосинтеза цистоцина. В кластере биосинтеза цистоцина идентифицирована N-ацетилтрансфераза *cstC*, которая ответственна за механизм собственной устойчивости продуцента за счет инактивации цистоцина путем N-ацилирования.

Личный вклад автора. Автором совместно с научным руководителем были определены цели и задачи научного исследования, а также разработаны пути их решения. Автором или при его непосредственном участии проведены работы по выделению микроорганизмов из природных источников, культивированию штаммов-продуцентов антибиотиков, выделению и очистке биологически активных соединений, обобщение и сравнение с литературными данными о биологической активности выделенных соединений, биоинформатический анализ полногеномных последовательностей штаммов-продуцентов антибиотиков. Автором проводилось культивирование штамма-продуцента циклоспорина *Tolypocladium inflatum* 13 и выделение циклоспорина А. При участии автора проведен сбор и обработка масс-спектрометрических данных. В процессе исследования микробиоты ассоциированной с муравьями-древоточцами автором выполнялось культивирование штамма-продуцента антимицинов *Streptomyces* sp. A10 и анализ его антагонистической активности в отношении энтомопатогенных штаммов грибов. Автором был выполнен геномный поиск последовательностей сходных с NRPS и PKS антимицина. При изучении микробиоты назальной полости венгерской домашней свиньи автором был проведен отбор проб слизистой носа, выделение микроорганизмов их идентификация и дальнейшее культивирование. Кроме того, автором был проведен скрининг на антибиотическую активность, подбор условий культивирования, анализ антибиотикорезистентности и первичная твердофазная экстракция активной ферментации, хроматографическое разделение смесей. Соискатель провел геномный поиск аналогов пуромицина, метаболомное исследование штамма *Streptomyces* sp. Ac-502, анализ кластера цистоцина и анализ на восприимчивость рекомбинантных клеток к цистоцину и пуромицину. При участии автора был проведен сбор и анализ литературных данных, а также подготовлен иллюстративный материал для обзоров литературы, опубликованных по теме диссертации.

Для работ, проводившихся совместно с другими подразделениями Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) или совместно с коллегами из других организаций, в тексте диссертации приведены соответствующие сноски. В работе использованы экспериментальные данные, полученные в других лабораториях и в рамках научного сотрудничества с другими организациями: первичное культивирование и микробиологическое изучение штамма-продуцента *Streptomyces albidiflavus* A10 проводилось к.б.н. н.с. Закалюкиной Ю.В. и к.б.н. с.н.с. Бирюковым М.В. (факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова), культивирование и микробиологическое изучение штамма-продуцента *Streptomyces* sp. VKM Ac-502 проводилось Стародумовой И.П., Буевой О.В., Евтушенко Л.И., Арискиной Е.В. (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Ингибирование трансляции и получение

резистентных клеточных линий проводилось к.х.н. Лукьяновым Д.А. (Сколтех), Мариной В.И. и Зотовой П.А. (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Масс-спектры регистрировались м.н.с. Чистовым А.А., к.х.н. н.с. Белозеровой О.А. (ГНЦ ИБХ РАН), к.б.н. с.н.с. Бирюковым М.В. (МГУ им. М. В. Ломоносова).

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2024-536 «Онкотераностика и проблемы резистентности к противоопухолевым и антибактериальным препаратам»).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (27–30 сентября, 2020, Нижний Новгород, Россия); The 45th FEBS Congress (3–7 июля, 2021, Любляна, Словения); VII Съезде биохимиков и молекулярных биологов России и X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (3–7 октября, 2022, Сочи – Дагомыс, Россия); The 2nd International Electronic Conference on Antibiotics Drugs for Superbugs: Antibiotic Discovery, Modes of Action And Mechanisms of Resistance, 2022; VIII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (24–27 апреля, 2023, Санкт-Петербург, Россия).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 194 страницах и состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 420 ссылок. Диссертация содержит 84 рисунка и 7 таблиц.

Публикации. По материалам работы опубликовано 7 статей в международных рецензируемых журналах, 5 тезисов докладов на научных конференциях и получен 1 патент РФ на изобретение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Установление продукции циклоспоринов грибом морского происхождения *Tolypocladium inflatum*

Морские грибы являются перспективным источником биологически активных вторичных метаболитов. Данные о грибном разнообразии северных морей, в частности, донных отложений, немногочисленны, а информация о грибах-продуцентах антибиотиков из донных грунтов Белого моря отсутствует. В рамках диссертационной работы был исследован штамм гриба, выделенный из донных отложений Кандалакшского залива Белого моря (66°33'14.0"N, 33°07'26.0"E). В ходе скрининга был отобран штамм *T. inflatum* 13 (МК020176), обладающий противогрибковой активностью. Культивирование проводилось в жидкой среде Чапека. В результате фракционирования этилацетатного экстракта культуральной жидкости с помощью ВЭЖХ были выделены фракции с противогрибковой активностью в отношении *Aspergillus niger*. Состав активной фракции был выяснен с помощью масс-спектрометрического анализа. Типичный LC/MS-анализ активной фракции представлен на Рис. 1. На хроматограмме экстрагированных ионов (EIC), обнаружены две группы пиков с различными временами удерживания.

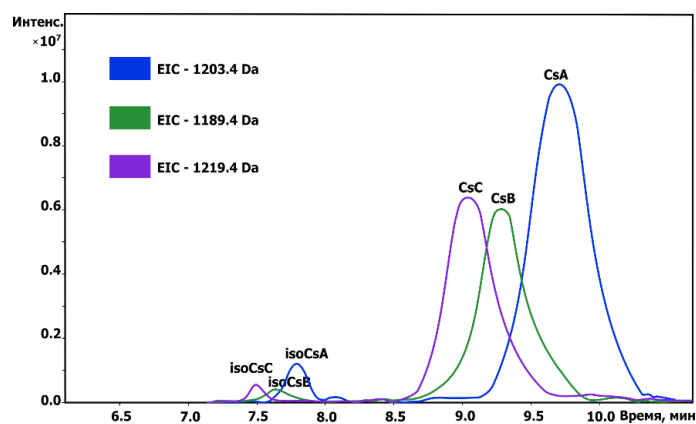


Рис. 1. EIC, соответствующее массам циклоспоринов А, В, С, выделенных из культуральной жидкости гриба

Соединения были проанализированы методом LC/MS-MS с масс-фрагментацией с использованием библиотеки MS/MS спектров GNPS, в результате чего было установлено, что противогрибковая активность фракции была связана с продукцией циклоспорина А (CsA) (Рис. 2). Спектры фрагментаций $[M+H]^+$ и $[M+2H]^+$ активных веществ соответствовали литературным. Кроме того, были идентифицированы циклоспорины В (CsB) и С (CsC) (Рис. 1, 2). Циклоспорины являются обычными метаболитами для почвенных штаммов *T. inflatum*, но среди морских грибов ранее они не были обнаружены. Согласно литературным данным, в условиях масс-спектрометрии циклоспорины могут самопроизвольно перегруппировываться в изоциклоспорины. Изоциклоспорин А (isoCsA) полностью лишен иммуносупрессивных свойств, поэтому его присутствие в субстанции циклоспорина А нежелательно.

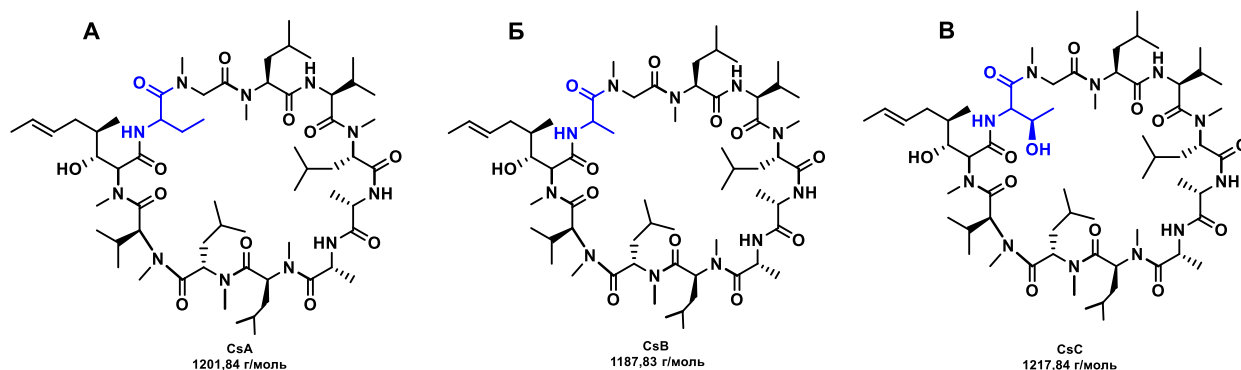


Рис. 2. Химические структуры циклоспоринов (А) – CsA, (Б) – CsB и (В) – CsC

Исследуя стабильность препаратов циклоспорина, было показано образование примесей неактивного изоциклоспорина.

2. Разработка способа масс-спектрометрической идентификации циклоспорина А в присутствии изоциклоспорина А

Циклоспорин А (CsA) – циклический ундекапептид (Рис. 3) с широким спектром биологической активности, один из наиболее часто используемых иммуносупрессивных препаратов. Семь из одиннадцати аминокислот в составе CsA являются N-метилованными, включая (4*R*)-4-((*E*)-2-бутенил)-4, N-диметил-L-треонин (*MeBmt*). Все циклоспорины, содержащие β-гидрокси-аминокислоту *MeBmt*, могут претерпевать перегруппировку путем N→O ацильного сдвига в кислых условиях. Кислые условия способствуют N→O ацильному сдвигу в паре *MeVal*¹¹-*MeBmt*¹ CsA, что приводит к образованию isoCsA (Рис. 3).

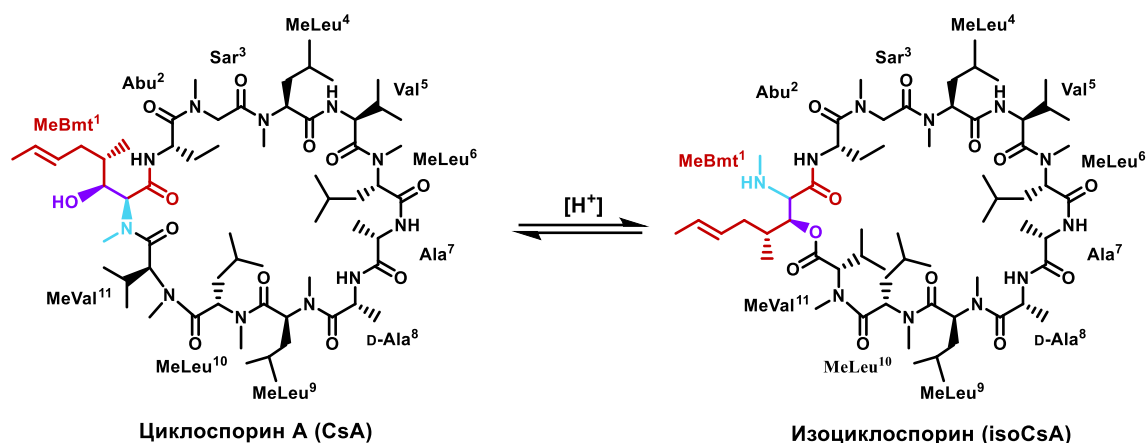


Рис. 3. Перегруппировка циклоспорина A в изоциклоспорин A

Для дальнейшего обсуждения закономерностей масс-спектрометрического анализа требуется использование системы дескрипторов. В данной работе используется обновленная система, основанная на ранее предложенной номенклатуре для секвенирования циклоспоринов (для наглядности см. Рис. 4). Фрагментный ион обозначается как $x_n^{(e-f)}$, где x соответствует типу иона по принятой классификации (строчные буквы a , b , c). Индекс n указывает количество аминокислотных остатков, сохраненных в ионе, а верхние индексы e и f обозначают аминокислоты, между которыми произошел разрыв амидной связи. При этом e и f соответствуют N- и C-концевым аминокислотным остаткам, соответственно. Для наглядности массы ионов в масс-спектрах представлены целыми числами. В случае N-метилированных аминокислот применялся префикс *Me* (например, *MeLeu* — N-метиллейцин).

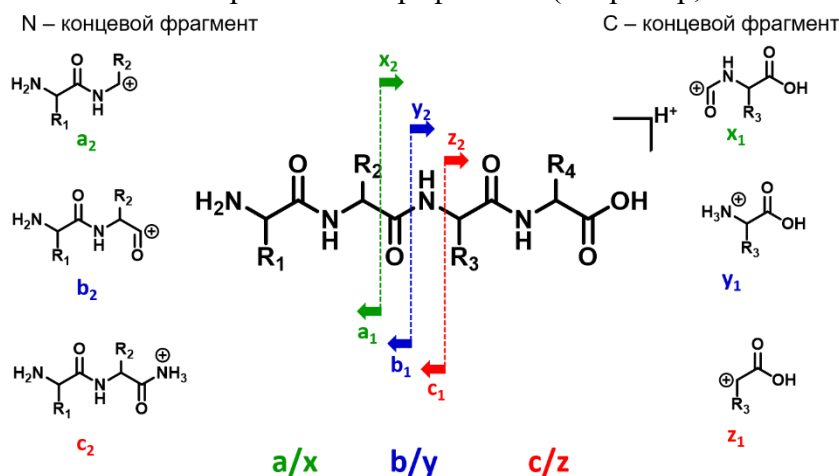


Рис. 4. Схема фрагментации пептидов

В ординарном масс-спектре LC/MS картины фрагментации однозарядных ионов CsA и isoCsA абсолютно идентичны, включая даже относительные интенсивности, что не позволило его использовать для различения между циклоспорином и его изомером (Рис. 5).

Анализируя MS-спектры выделенных соединений, мы наблюдали интенсивные дважды протонированные ионы. CID (collision-induced dissociation)-спектры этих ионов демонстрировали высокую степень фрагментации и, что более важно, значительно отличались между основными и минорными соединениями. Важнейшей задачей было понять природу минорных соединений. Тщательное изучение фрагментации ионов $[M+2H]^{2+}$ показало, что в обоих спектрах присутствуют интенсивные ионы серии b_n^{6-5} , которые ранее были описаны для циклоспоринов (Рис. 6). В случае циклоспорина A и его изомера наблюдали ионы 637 (b_6^{6-5}), 524 (b_5^{6-5}) и 397 (b_4^{6-5}).

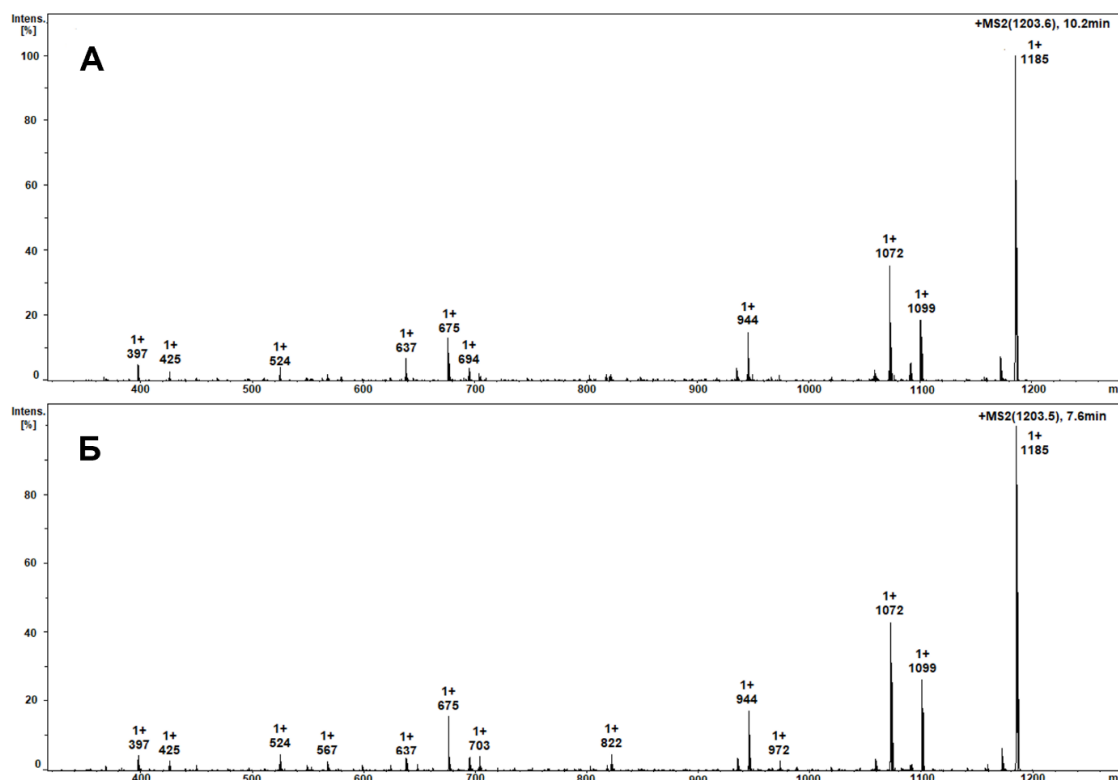


Рис. 5. CID MS2 фрагментация $[M+H]^+$ ионов (m/z 1203) (А) циклоспорина А, (Б) изоциклоспорина А

Картина CID MS² фрагментации спектров $[M+2H]^{2+}$ ионов (m/z 602) CsA (Рис. 6) включает в себя как хорошо известные механизмы диссоциации, так и уникальные пути фрагментации. Несмотря на сложность этих закономерностей для изобарных смесей ионов, они оказались характерны и могут быть применимы для структурной идентификации CsA.

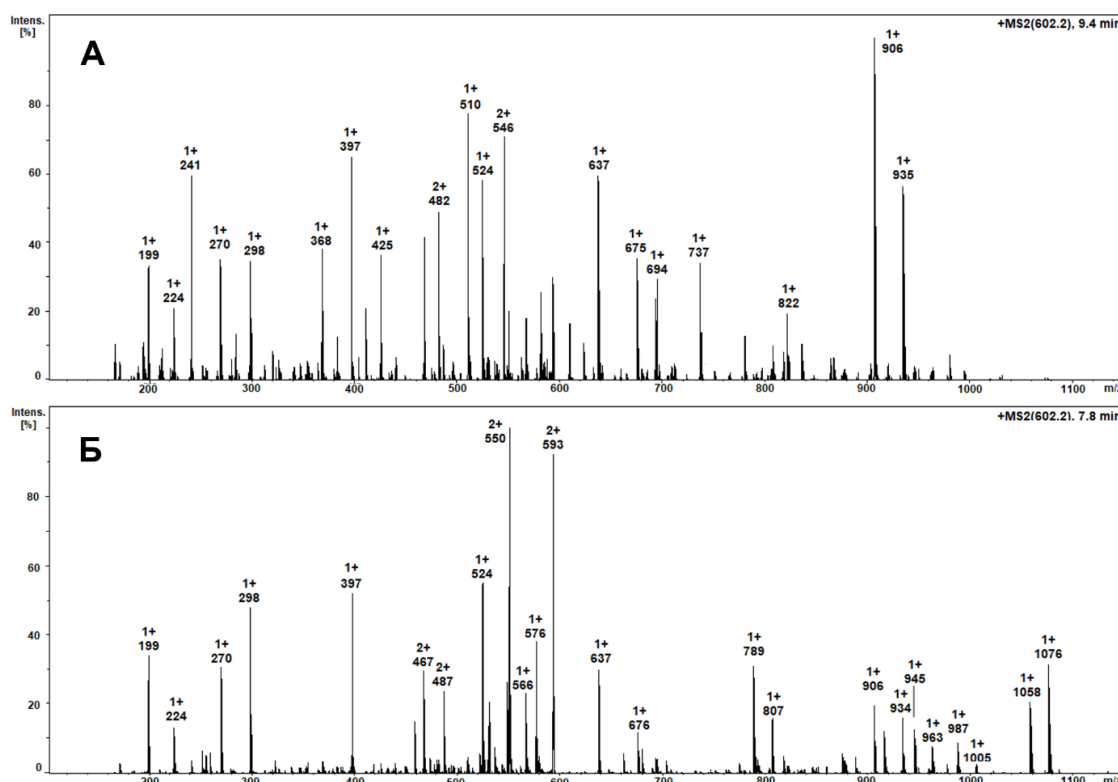


Рис. 6. CID MS2 фрагментация $[M+2H]^{2+}$ ионов (m/z 602) CsA (А) и isoCsA (Б), полученных на стандартных образцах

Для спектров фрагментации CsA характерно расщепление по схеме 6-5. В $[M+2H]^{2+}$ CID CsA дополнительно регистрируется интенсивный ион b_8^{6-5} (m/z 906, интенсивность 100%) в этой ионной серии. Природа этого иона подтверждается MS^3 -экспериментом (последующие ионы серии являются производными от этого). Более того, спектры CID $[M+2H]^{2+}$ CsB и CsC содержат одну и ту же серию ионов b_n^{6-5} , где только b_8^{6-5} включает прирост массы (m/z 922 для CsC, 893 для CsB), коррелирующий с вероятной структурой иона, а b_8^{6-5} является последним ионом серии, содержащим переменную вторую аминокислоту. В MS^3 -спектрах иона m/z 906 также присутствуют пики, соответствующие гораздо менее типичной серии ионов a_n^{3-2} (например, a_7^{3-2} m/z 667), что позволяет предположить, что этот пик может быть суперпозицией ионов b_8^{6-5} и a_9^{3-2} . Смешанная природа этого иона может объяснить его аномально высокую интенсивность. Другой интенсивный ионный ряд, обнаруженный в $[M+2H]^{2+}$ CID-спектрах всех циклоспоринов – b_n^{3-2} , в котором отсутствует только ион b_{10} . Эта ионная серия начинается с потери второй аминокислоты, поэтому ионы в серии имеют одинаковые m/z для CsA, CsB, CsC (b_9^{3-2} – b_2^{3-2} имеют m/z значения 935, 822, 694, 567, 496, 425, 298, 199, соответственно). Интересно, что серия ионов b_n^{1-11} , наиболее распространенная в ранее описанных $[M+H]^+$ спектрах циклоспоринов, соответствующая типичному расщеплению 1-11, имеет очень низкую интенсивность. Более того, серия b_n^{1-11} –18, обычно связанная с перегруппировкой в изоциклоспорины, полностью отсутствует (для наглядности см. Рис. 7).

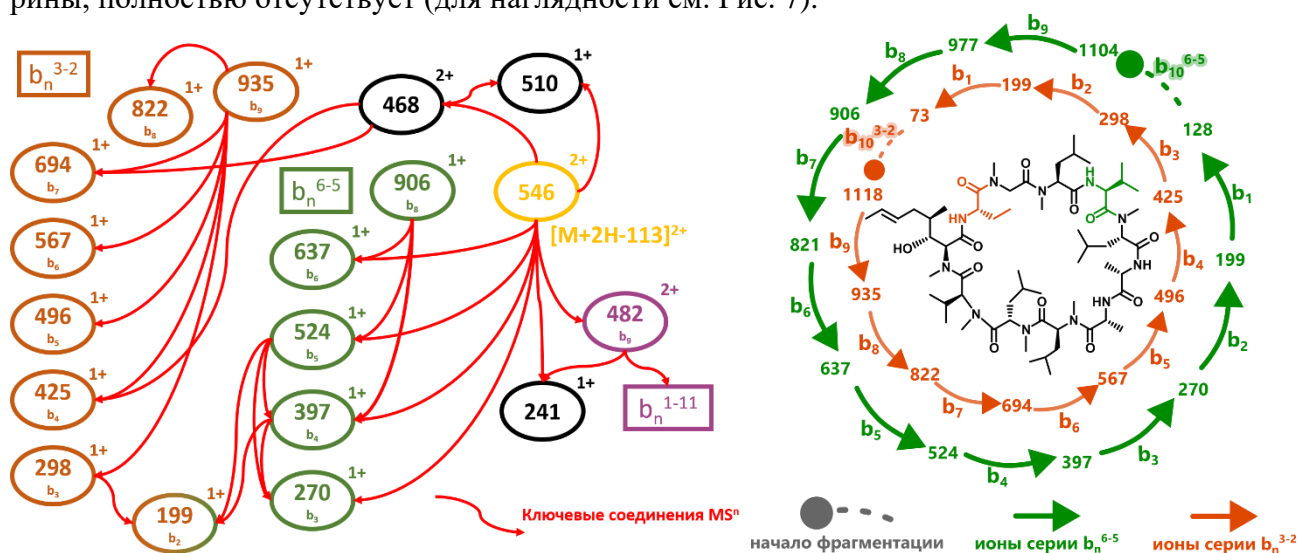


Рис. 7. Слева анализ MS/MS расщепления дважды протонированного молекулярного иона CsA с m/z 602. Справа схематическое изображение наиболее интенсивных фрагментаций CsA. Пунктирная дуга – первичный разрыв, начало фрагментации, зеленые стрелки – фрагментация по пути b_n^{6-5} , оранжевые стрелки – фрагментация по пути b_n^{3-2}

Одной из наиболее примечательных особенностей CID-спектров ионов $[M+2H]^{2+}$ является наличие уникальных фрагментных ионов, формирующихся исключительно из дважды протонированных предшественников. В первую очередь, это все ионы с двойным зарядом. Самым интенсивным из них в спектре фрагментации CsA оказался ион с m/z 546. Данный ион $[M+2H-113]^{2+}$ может представлять собой суперпозицию двух изобарных компонентов: одного – образующегося при расщеплении боковой цепи C–C в структуре CsA, и второго – соответствующего иону b_{11}^{1-11} . Подобное происхождение ранее также предполагалось для его однозарядного аналога $[M+H-113]^+$ с m/z 1089. Хотя MS^3 -спектры данного смешанного иона не поддаются однозначной интерпретации, наблюдали его фрагментацию с образованием ионов серии b_n^{3-2} , а также двухзарядного иона с m/z 482. Последний, по-видимому, представляет собой дважды протонированный аналог b_9^{1-11} и далее приводит к формированию серии b_n^{1-11} . Вероятно, ион b_1^{1-11} присутствует лишь в незначительном количестве в составе смеси, поскольку его соответствующий ион b_n^{1-11} демонстрирует очень слабую интенсивность в MS^2 и четко проявляется только в MS^3 -спектре

фрагментации иона m/z 482. Помимо b_n^{1-11} при распаде указанного иона образуется фрагмент с m/z 241, который также хорошо виден в исходном MS/MS-спектре. Поскольку данный ион ранее не фиксировался в CID-спектрах $[M+H]^+$ для CsA, он может возникать исключительно из дважды протонированных ионов, возможно, в результате перегруппировки или разделения заряда. Структуры наиболее характерных фрагментов CsA представлены на Рис. 7, а полная таблица типичных фрагментационных ионов приведена в приложении к диссертации.

Дополнительно в спектре был обнаружен дважды протонированный ион с m/z 468. Этот ион мог бы представлять собой дополнительно протонированный вариант иона b_9^{3-2} (m/z 935), однако в его MS³-спектре фиксируются лишь отдельные ионы из последующей серии b_n^{3-2} . Кроме того, при фрагментации этого иона образуется интенсивный однозарядный фрагмент с m/z 510, также происходящий от $[M+2H-113]^{2+}$. Подобные ионы, как и ранее упомянутый ион с m/z 241, вероятно, формируются в результате нетрадиционных механизмов, характерных именно для дважды протонированных форм. Таким образом, фрагментационная картина в CID-спектрах ионов $[M+2H]^{2+}$ включает как известные пути диссоциации, так и уникальные маршруты фрагментации. Несмотря на сложности, связанные с интерпретацией изобарных смесей ионов, данные особенности являются наиболее информативными для структурной идентификации CsA.

При сравнении спектров фрагментации isoCsA (Рис. 8), полученных в тех же условиях, были выявлены заметные отличия по сравнению с CsA. В спектре isoCsA регистрируется ион $[M+H-127]^+$ с m/z 1076, соответствующий потере остатка *MeLeu* – фрагмент, отсутствующий в спектрах CsA. Этот ион может возникать в результате различных первичных расщеплений главной цепи, включая b_{10}^{10-9} , b_{10}^{11-10} , b_{10}^{5-4} , b_{10}^{7-6} , все из которых теоретически имеют m/z 1076. Также в спектре присутствуют ионы, вероятно принадлежащие к серии b_n^{10-9} (например, b_7 с m/z 807, b_8 с m/z 934 и b_9 с m/z 1005), однако MS³-спектры этих ионов не воспроизводятся в повторных экспериментах, что указывает на их изобарную природу и, вероятно, суперпозицию нескольких фрагментов.

Кроме того, интенсивность серии ионов b_n^{3-2} для isoCsA заметно ниже, чем для CsA: большинство ионов этой серии (b_9 , b_8 , b_7 , b_5 , b_4) выражены слабо. Напротив, серия b_n^{6-5} хорошо прослеживается как в isoCsA, так и в CsA, за исключением иона b_7 , чья интенсивность снижена.

Фрагментация главной цепи также приводит к образованию серий b_n^{1-11} и $b_n^{1-11}-18$, последняя из которых связана с удалением *MeVal*¹¹ из isoCsA. В CID-спектре ионов $[M+2H]^{2+}$ isoCsA присутствуют ионы обеих серий, хотя их интенсивность умеренная. Анализируя общую картину фрагментации isoCsA, можно отметить качественные различия по сравнению с CsA. Прежде всего, большинство пиков в диапазоне m/z 750–1100 (Рис. 5), сопровождаются потерей молекулы воды. Аналогичная дегидратация наблюдается не только для серии b_n^{1-11} , но и для большинства других фрагментов. Предположительно, потеря воды с одновременным удалением заряда служит альтернативным путем рассеяния энергии у isoCsA, что приводит к снижению степени фрагментации и накоплению фрагментов с более высокой массой.

Анализируя фрагментные ионы, образованные только из дважды протонированных форм, мы наблюдаем ту же тенденцию к потере воды, а наиболее интенсивно заряженным фрагментным ионом является $[M+2H-H_2O]^{2+}$ с m/z 593. MS³-спектр этого иона показывает его родство с дегидратированным вариантом серии b_n^{10-9} (для наглядности см. Рис. 8) и с другим уникальным двухзарядным ионом с m/z 550. Мы предполагаем, что этот ион является $[M+2H-104]^{2+}$ – дважды протонированным вариантом иона с m/z 1099, характерным для $[M+H]^+$ CID-спектров isoCsA. Вероятно, этот ион образуется при элиминировании изовалериановой кислоты. Все эти предположения относительно структур фрагментных ионов хорошо подтверждаются при сравнении с наборами данных isoCsC и isoCsB.

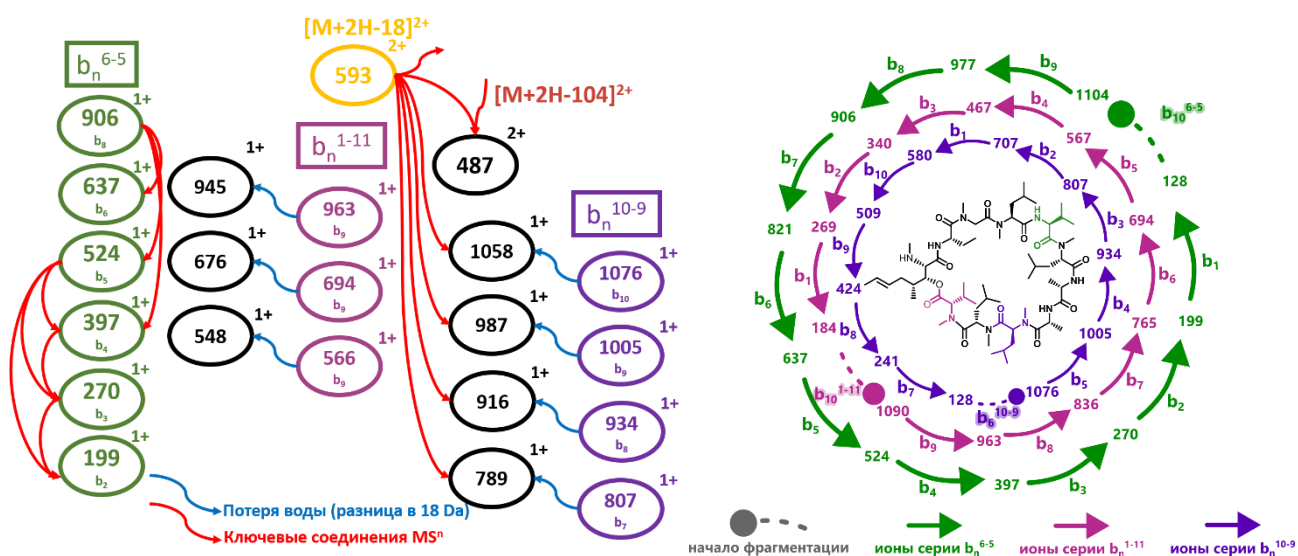


Рис. 8. Слева анализ MS/MS расщепления дважды протонированной молекулы isoCsA с m/z 602. Справа Схематическое изображение наиболее интенсивных фрагментаций isoCsA. Пунктирная дуга – первичный разрыв, начало фрагментации, зеленые стрелки – фрагментация по пути b_n^{6-5} , розовые стрелки – фрагментация по пути b_n^{1-11} , фиолетовые стрелки – фрагментация по пути b_n^{10-9}

Был идентифицирован ряд уникальных фрагментных ионов, позволяющих надежно различать циклоспорины и продукты их N→O ацильной перегруппировки с использованием относительно доступного MS/MS-оборудования. Выявленные фрагментные ионы могут быть использованы для прямого обнаружения примесей isoCsA в образцах CsA с помощью нехроматографических масс-спектрометрических методов. Благодаря выраженным как качественным, так и количественным различиям в спектрах, для реализации метода подходят даже приборы с невысоким разрешением. Кроме того, предложенный подход не требует применения хроматографических стандартов или использования систем постколоночной дериватизации.

Существуют многочисленные хроматографические методы количественного анализа CsA с пределом обнаружения в диапазоне 100–200 мкг/л. Однако CsA и его аналоги представляют собой неполярные, поглощающие УФ-излучение, но нефлуоресцирующие соединения, склонные к уширению пиков при ВЭЖХ, что затрудняет их обнаружение данным методом. В то же время масс-спектрометрические методы, использующие регистрацию протонированных молекул CsA, позволяют снижать предел обнаружения до 7–10 мкг/л, тогда как методы MS/MS, основанные на фрагментации однозарядных аддуктов CsA, обеспечивают предел обнаружения в диапазоне 0.5–1.0 мкг/л.

Настоящая работа представляет новый подход к анализу масс-спектров CsA и isoCsA. Метод, основанный на обнаружении ионов $[M+H]^+$, демонстрировал предел обнаружения свыше 100 мкг/л, тогда как для ионов $[M+2H]^{2+}$ этот показатель составил 85 мкг/л. Количественные методики, ориентированные на регистрацию двухзарядных ионов, повышают чувствительность анализа. Выявленные фрагментационные особенности и пределы обнаружения, установленные в рамках данного подхода, являются основой для дальнейшей разработки аналитических методик.

3. Метаболомное исследование микробиоты слизистой носовой полости свиньи

Несмотря на широкие и всесторонние исследования микробиоты млекопитающих, случаев получения антибиотиков из этого перспективного источника не много. На сегодняшний день исследование микробиоты носа домашних свиней описано в ограниченном числе источников, в основном в контексте здоровья дыхательной системы и патогенеза инфекций, вызванных *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* и другими микроорганизмами. Однако носовая микробиота свиней до сих пор практически не рассматривалась как источник бактерий-продуцентов антимикробных веществ. В рамках диссертационной работы изучено микробное сообщество, выделенное из микробиоты слизистой оболочки носа венгерской домашней свиньи (*Sus domesticus*) породы Мангалица. Выбор данной породы свиней в качестве источника возможных продуцентов антибиотиков был обусловлен, во-первых, образом жизни животных – постоянном контакте с окружающей средой, а во-вторых, фактом, что до отбора проб в течение всей своей жизни животные не подвергались антибиотикотерапии. Выделено в индивидуальном виде 20 штаммов микроорганизмов. Изучена их способность продуцировать антибиотические метаболиты. Большинство выделенных штаммов (18) были бактериями, один штамм – мицелиальным и один – дрожжевым грибом. Из этих 18 первичных бактериальных изолятов, 8 изолятов (SM-1, SM-2, SM-7, SM-8, SM-9, SM-12, SM-18, SM-19) показали положительный результат при окрашивании по Граму, остальные были грамотрицательными бактериями. Филогенетический анализ первичных изолятов (Таблица 1) показал идентичность среди изолятов SM-1 и SM-2; SM-3, SM-4 и SM-5; SM-7 и SM-8; SM-15, SM-16 и SM-17.

Таблица 1. Филогенетический анализ штаммов, выделенных из носовой полости свиньи.

Штамм	Ближайший типовой штамм в Genbank
SM-1, SM-2	<i>Nocardiosis alba</i> DSM 43377 ^T
SM-3, SM-4, SM-5	<i>Moraxella porci</i> DSM 25326 ^T
SM-6	<i>Rhodotorula frigidialcoholis</i> EXF 10854 ^T
SM-7	<i>Weissella cibaria</i> JCM 12495 ^T
SM-8	<i>Weissella confusa</i> JCM 1093 ^T
SM-9	<i>Enterococcus italicus</i> DSM 15952 ^T
SM-10	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8030 ^T
SM-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T
SM-12	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> JCM 5805
SM-13	<i>Glaesserella parasuis</i> NCTC 4557 ^T
SM-14	<i>Proteus cibi</i> DSM 106178 ^T
SM-15, SM-16, SM-17	<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> ATCC 13880 ^T
SM-18	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T
SM-19	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3 ^T
SM-20	<i>Chaetomium anastomosans</i> CGMCC 3.19350 ^T

Дополнительное подтверждение видовой принадлежности проводилось с использованием биохимических данных по утилизации субстратов, ферментативной активности и способности продуцировать сероводород. Таким образом, для идентификации выделенных микроорганизмов был использован полифазный подход, сочетающий анализ их филогенетического положения на основе анализа нуклеотидных последовательностей значимых геномных фрагментов с оценкой их морфологических и биохимических характеристик.

В результате скрининга антибиотической активности был отобран штамм *P. aeruginosa* SM-11, проявляющий активность против грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) и дрожжей

(*Candida albicans* CBS 8837). В процессе проверки антагонистической активности методом поперечных полос в отношении *E. coli* ATCC 25922 штамм SM-11 начал продуцировать синий флуоресцирующий пигмент. Но после нескольких пассажей продукция пигмента прекращалась. Культивирование штамм SM-11 на чашке Петри совместно с *E. coli* ATCC 25922 возвращало продукцию пигмента. С помощью ВЭЖХ-МС-метабономики в экстракте штамма *P. aeruginosa* SM-11 идентифицирован ряд антимикробных соединений (пиохелин, пиолутеорин и гликолипид RhaC10C10) (Рис. 9). Флуоресцирующим пигментом оказался феназиновый антибиотик пиоцианин.

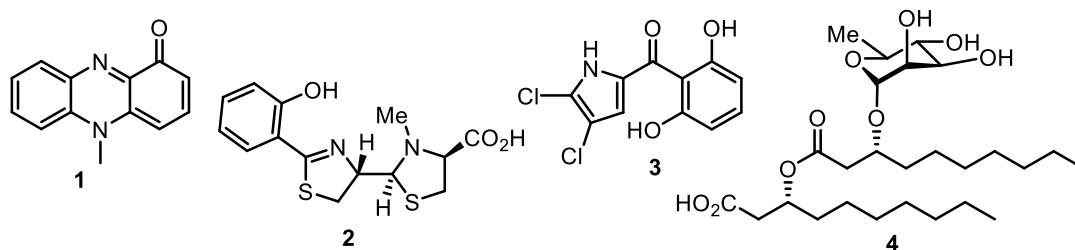


Рис. 9. Антибиотики, продуцируемые штаммом SM-11 *P. aeruginosa*: 1 – пиоцианин, 2 – пиохелин, 3 – пиолутеорин, 4 – гликолипид RhaC10C10

Таким образом, было показано, что продукция вторичных метаболитов изменяется при совместном культивировании штамма SM-11 с *E. coli* ATCC 25922. Микробиота, ассоциированная с млекопитающими, представляет существенный интерес в качестве источника антимикробных соединений, а для ее дальнейшего изучения наиболее перспективны биотехнологические подходы, основанные на индукции биосинтеза вторичных метаболитов с помощью со-культивирования с микроорганизмами.

4. Антибиотики из микробиоты, ассоциированной с муравьями-древоточцами

Микроорганизмы проникают в гнезда муравьев разными путями. Во-первых, мертвая древесина – основа муравьиных гнезд – часто колонизирована различными нитчатými грибами, основными разрушителями целлюлозы и лигнина в наземных экосистемах. Во-вторых, постоянные контакты муравьев с почвой, являющейся богатейшим природным резервуаром микробного разнообразия, способствуют переносу клеток и спор сапротрофных микроорганизмов на их кутикуле. В-третьих, особенности питания муравьев, особенно плотоядных видов, таких как *Camponotus vagus*, предполагают сбор и транспортировку в гнездо различных насекомых, часть из которых может быть заражена патогенами. Таким образом, необходимость защиты гнезда от патогенных грибов может стимулировать симбиоз между муравьями-древоточцами и микроорганизмами, способными синтезировать антимикробные вещества. Муравьи-древоточцы *C. vagus*, изученные в данной работе, были собраны из одного гнезда (Рязанская область, Россия). Среди мицелиальных актинобактерий в образцах *C. vagus* доминировал штамм *Streptomyces* sp. A10. По филогенетическим, морфологическим и биохимическим признакам изолят отнесен к виду *Streptomyces albidoflavus*. Активность в отношении дрожжей *Candida albicans* позволила выявить у этого штамма заметный противогрибковый потенциал, поэтому была оценена его способность подавлять ряд энтомопатогенных грибов: *Ophiocordyceps sinensis* VKPM F-1479, *Conidiobolus coronatus* VKPM F-1359, *Beauveria bassiana* VKPM F-1357, *Conidiobolus coronatus* VKPM F-442, *Metarhizium rileyi* VKPM F-1360, *Lecanicillium lecanii* VKPM F-837. Большинство энтомопатогенов проявили высокую чувствительность к ингибирующему действию штамма *Streptomyces albidoflavus* A10.

ВЭЖХ-анализ показал, что противогрибковая активность связана с фракциями, содержащими гидрофобные соединения, характеризующиеся высоким временем удерживания на колонке с обращенной фазой C18 и элюирующиеся при содержании органического растворителя 90% (Рис. 10).

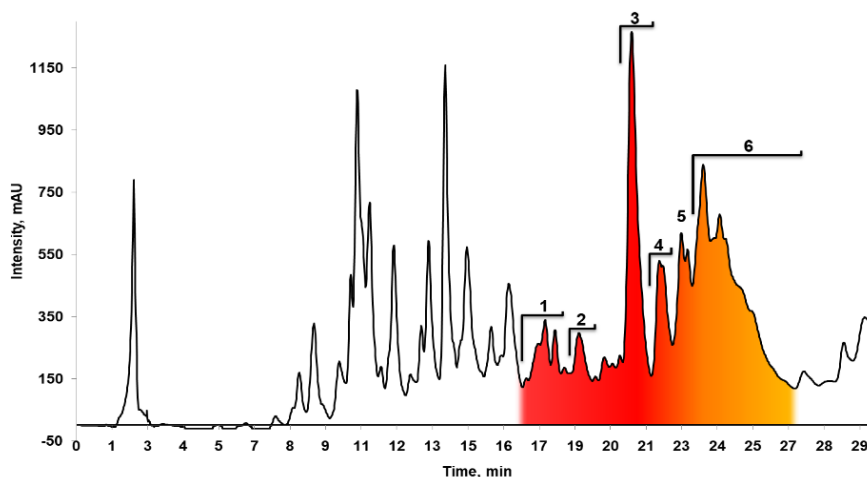


Рис. 10. Профиль ВЭЖХ противогрибковой фракции штамма *Streptomyces albidoflavus* A10. Цветовым градиентом обозначены фракции с противогрибковой активностью

Соединения были проанализированы методом LC/MS с масс-фрагментацией с использованием библиотеки MS/MS спектров GNPS, в результате чего было установлено, что противогрибковые соединения являются компонентами комплекса антимицина А (Рис. 11). Депсипептиды антимицинового типа представляют собой семейство природных соединений, имеющих общий структурный мотив, состоящий из макроциклического кольца с амидной связью с 3-формаидосалицилатной единицей. Эти соединения продуцируются многими видами актиномицетов и отличаются значительным структурным разнообразием, включая различные размеры колец (существуют 9-членные, 15-членные и 18-членные депсипептиды антимицинового типа) (Рис. 11).

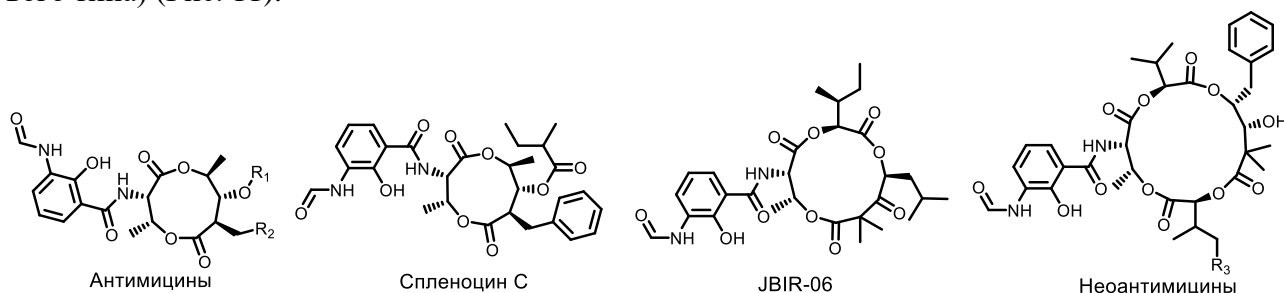


Рис. 11. Депсипептиды антимицинового типа

Для оценки возможного разнообразия антимицинов подобных депсипептидов, продуцируемых в симбиозе с насекомыми, был выполнен геномный поиск последовательностей сходных с NRPS и PKS антимицина (Рис. 12).

Кластер, к которому принадлежит *Streptomyces* sp. A10 (Рис. 13), включает несколько штаммов, выделенных из муравьев-листорезов *Acromyrmex volcans*, а также штамм, выделенный из грибоного сада из гнезда муравья *Acromyrmex octospinosus*. И тот факт, что все эти штаммы способны синтезировать противогрибковые антимицины предполагает, что генетически родственные актинобактерии могут быть вовлечены в защитные симбиозы благодаря способности синтезировать сходные метаболиты, кодируемые родственными генетическими кластерами.

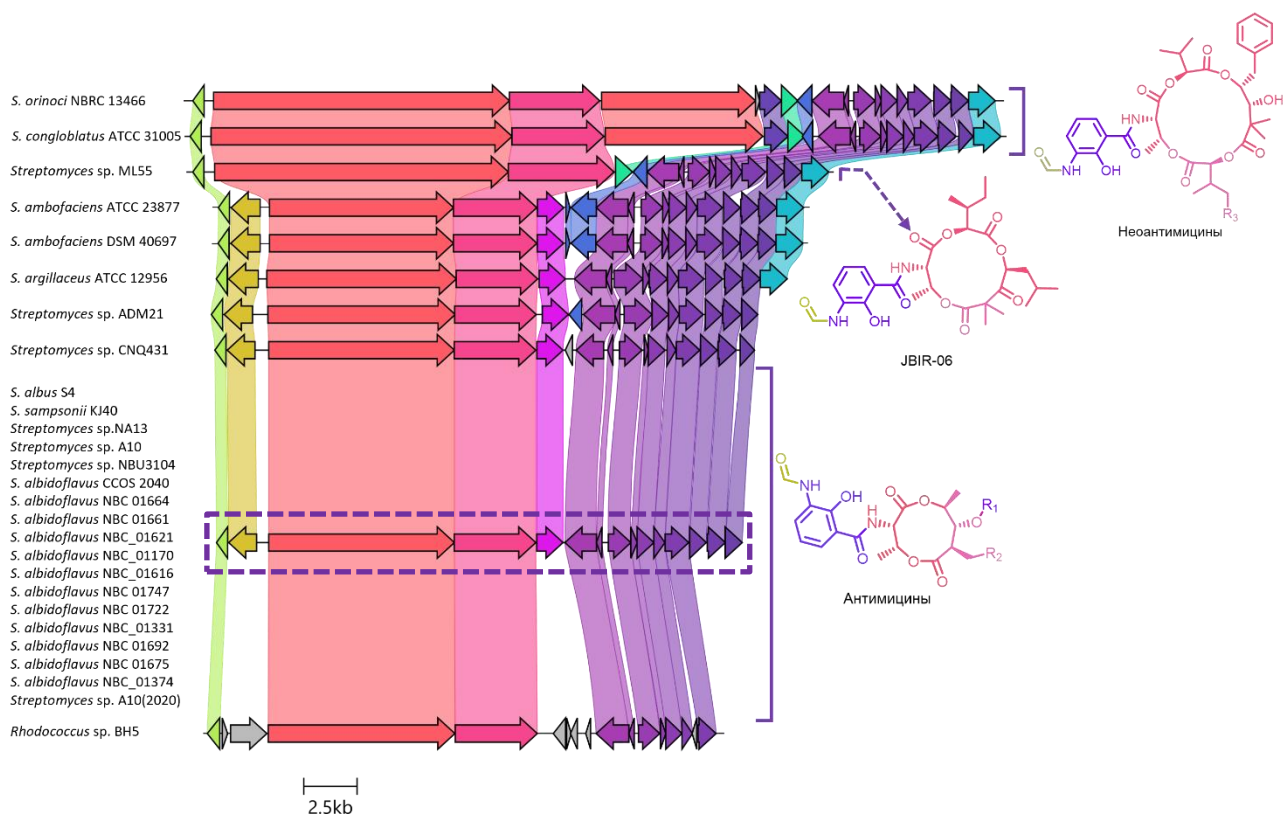


Рис. 12. Геномный анализ биосинтетических генных кластеров антимицинов. Пунктирной линией обозначен предполагаемый кластер штамма *Streptomyces* sp. A10

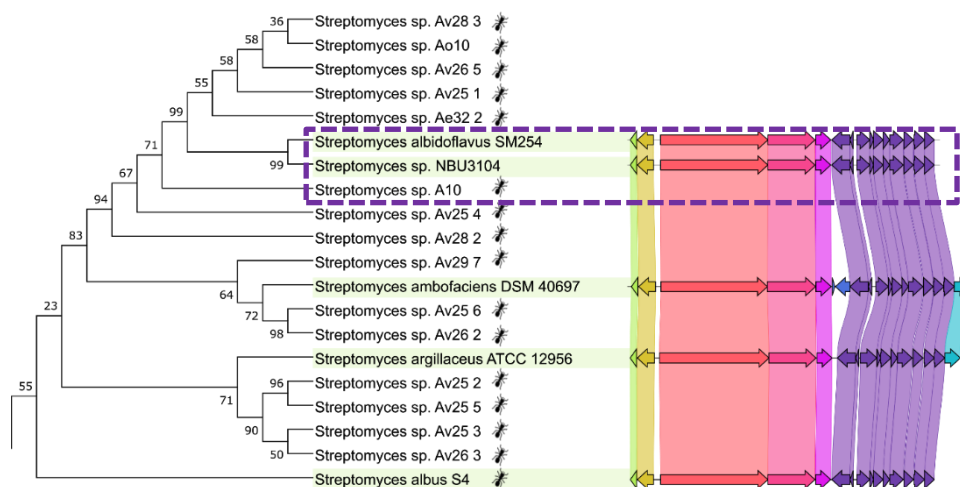


Рис. 13. Сопоставление кластеров антимицина и штаммов входящих в филогенетически отличающуюся группу стрептомицетов, выделенных из муравьев. Пунктирной линией обозначен предполагаемый кластер штамма *Streptomyces* sp. A10

Исходя из данных филогенетического дерева (Рис. 13) видно, что штамм *Streptomyces* sp. A10 входит в группу продуцентов антимицинов из муравьев, филогенетически отличающуюся от большинства изолятов выделенных из почвы. Мы сопоставили имеющиеся кластеры антимицинов для *Streptomyces albidoflavus* SM254, *Streptomyces* sp. NBU3104, *Streptomyces ambofaciens* DM 40697, *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, *Streptomyces* sp. S4, которые входят в группу изолятов из муравьев (Рис. 13) и обнаружили, что для этой области характерна продукция депсипептидов антимицинового типа всех трех форм.

Таким образом антимицины могут быть ассоциированы помимо муравьев-листорезов также с муравьями-древоточцами, что позволяет нам сделать предположение, что и у других видов муравьев существует высокое физиологическое значение симбионтов.

5. Геномный поиск аналогов антибиотика пурамицина

Антибиотики микробного происхождения являются продуктами биосинтеза. Этот процесс превращения из простых предшественников в сложные кодируется в геноме микроба как правило в виде биосинтетического генного кластера (БГК). Поиск кластеров биосинтетических генов в метагеномных данных и их последующая гетерологическая экспрессия теоретически открывают нам весь биосинтетический потенциал микроорганизмов. Развитие технологий секвенирования нового поколения привело к признанию микробных геномов как богатого ресурса для открытия новых природных соединений. Поиск биосинтетических генных кластеров в метагеномных данных позволяет выявлять скрытый биотехнологический потенциал даже у тех микроорганизмов, которые считаются хорошо культивируемыми и изученными. В рамках следующего этапа исследования для выявления перспективных продуцентов аналогов известных антибиотиков был применен подход геномного майнинга. Была проведена идентификация новых продуцентов аналогов антибиотиков. В качестве объекта исследования был выбран аминонуклеозидный антибиотик пурамицин (Purо). Пурамицин является ингибитором синтеза белка, действующим за счет имитации аминокислотного конца тРНК, взаимодействующего с А-сайтом рибосомы.

Несмотря на широкое применение пурамицина в биотехнологических и молекулярно-биологических исследованиях, молекулярные механизмы его биосинтеза до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Одним из ключевых этапов биосинтеза пурамицина является конъюгация аминокислоты тирозина с нуклеотидным фрагментом (Рис. 14А,Б). Согласно данным, полученным при аннотации биосинтетического генного кластера пурамицина, данная реакция катализируется уникальным ферментом Pur6. Фермент Pur6 представляет особый интерес с точки зрения биохимии и структурной биологии, поскольку обладает молекулярной массой около 84 кДа и не содержит каких-либо известных консервативных доменов, которые могли бы быть идентифицированы с использованием стандартных методов анализа гомологии аминокислотных последовательностей. Моделирование его пространственной структуры с использованием алгоритма AlphaFold 3 с последующим поиском структурных аналогов позволило установить лишь частичное структурное сходство с цистеиновой протеиназой гингипаином R (Рис. 14В).

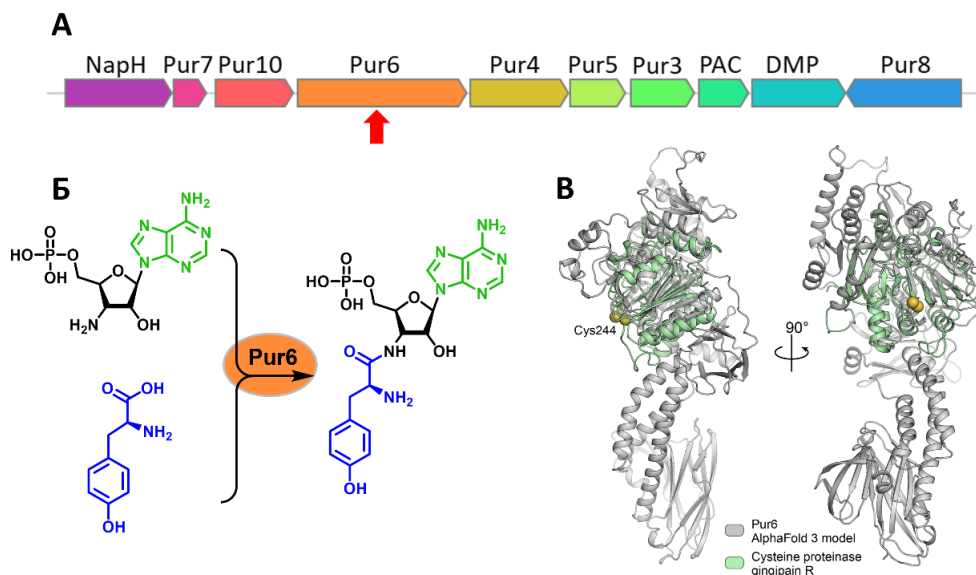


Рис. 14. Ключевой этап биосинтеза пурамицина опосредован уникальным ферментом Pur6. А) Биосинтетический генный кластер пурамицина. Б) Схематическое изображение реакции, катализируемой Pur6. В) Модель структуры Pur6, созданная с помощью AlfaFold3 (серый цвет), выровненная с цистеиновой протеиназой (зеленый цвет) гингипаином R (PDB ID: ICVR). Каталитические остатки Cys244 у гингипаина R и остаток Cys326 у Pur6 обозначены желтыми сферами

С целью оценки структурного и функционального разнообразия Pur6-подобных ферментов, а также выяснения возможного механизма их действия, был проведен геномный скрининг гомологичных последовательностей (Рис. 15). В результате были выявлены Pur6-подобные ферменты, тесно связанные с биосинтетическими генными кластерами пурамицина у различных представителей рода *Streptomyces*, включая *S. alboniger*, *S. cacaoi*, *S. luteocolor*, *S. silaceus*, *S. harbinensis*, *S. megasporus*, а также у *Saccharopolyspora phatthalungensis*. Анализ обнаруженных кластеров позволил выделить два принципиально различных типа архитектур: один соответствовал классическим пурамициновым БГК, тогда как второй отличался иным паттерном метилирования, что может свидетельствовать о различиях в структурах конечного продукта. (Рис. 15).

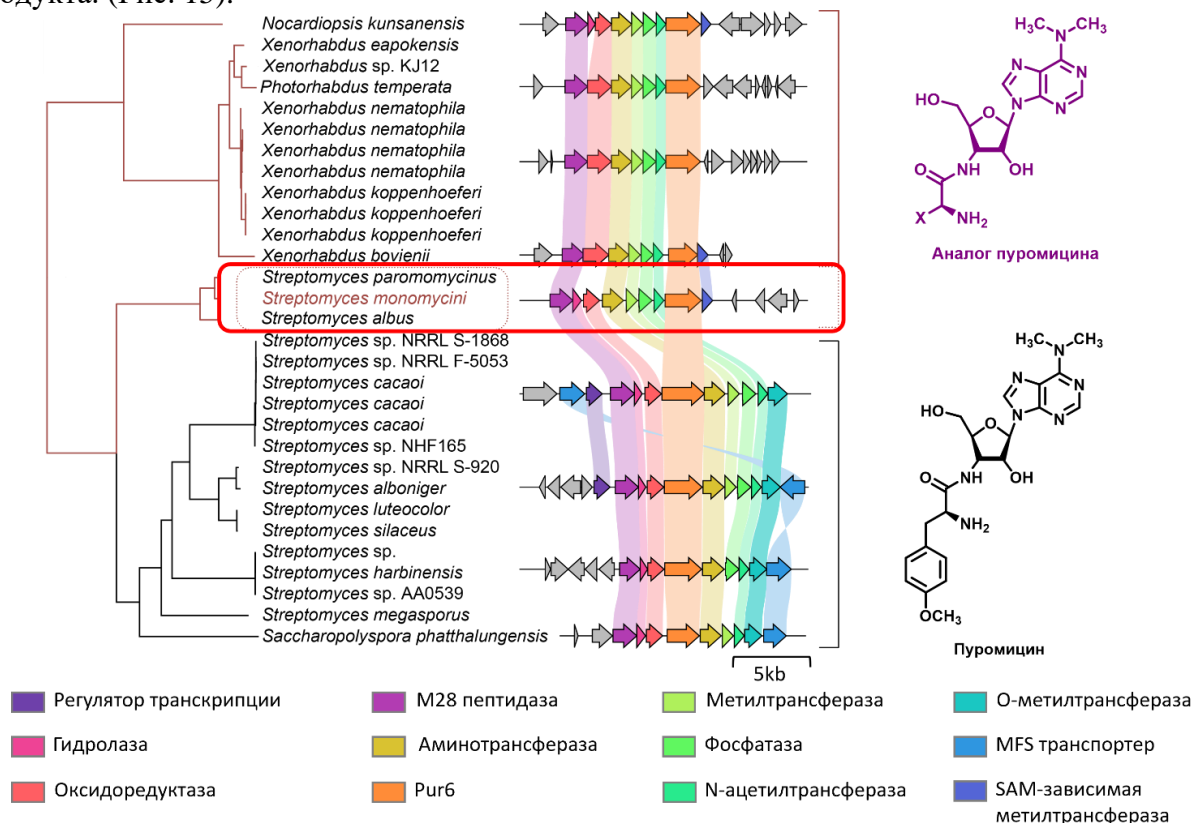


Рис. 15. Геномный анализ Pur6 подобных ферментов выявил биоразнообразие аналогов пурамицина у *Streptomyces* и *Xenorhabdus*. Pur6 и его гомологи тесно связаны с БГК пурамицино-подобных вторичных метаболитов. Филогенетическое дерево показывает расстояние между гомологами Pur6 в различных бактериях. Соответствующий геномный контекст и пурамициновые БГК окрашены серым и радужным цветом, соответственно. Предполагаемые БГК, связанные с биосинтезом пурамицина и биосинтезом пурамициноподобных аналогов, объединены скобками и окрашены в черный и красный цвета, соответственно. Предполагаемые новые аналоги пурамицина у стрептомицетов выделены красной линией

Детальный анализ геномного контекста БГК выявил тРНК^{Cys}, кодируемую на конце пурамициноподобных БГК у *N. kunsanensis* и *X. bovienii* (Рис. 16А). Аналогичные структуры были обнаружены на конце пурамициноподобных БГК у *Photorhabdus temperate* и других *Xenorhabdus*, включая *Xenorhabdus nematophila* (Рис. 16Б). Поэтому, пытаясь найти активированный предшественник аминокислот, мы предположили, что аминоксил-тРНК может служить донором аминокислот в реакции сопряжения, катализируемой Pur6-подобными ферментами (Рис. 16Б). Учитывая частичную структурную гомологию с цистеиновыми протеиназами, мы предполагаем, что Pur6 использует аминоксил-тРНК в качестве субстрата, а Cys326 участвует в образовании активного промежуточного продукта, что моделирует общий механизм активации ацила доменом белка-переносчика в NRPS и PKS. Если эта гипотеза верна, то продукт

биосинтеза пурамициноподобных БГК у *N. kunsanensis*, *X. bovienii* и *S. monomycini* должен содержать цистеинильный остаток.

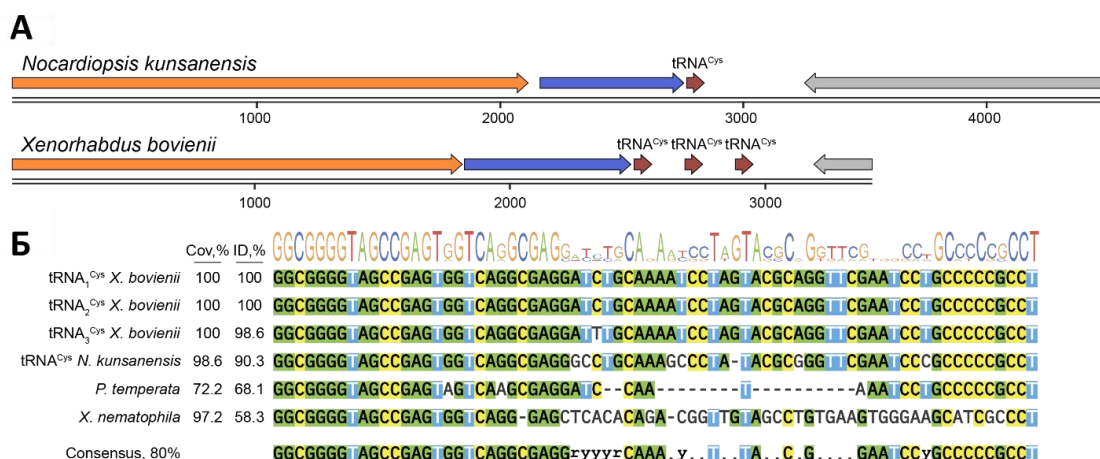


Рис. 16. А) БГК пурамициноподобных вторичных метаболитов у *N. kunsanensis* и *X. bovienii* имеют тРНК^{Cys}. Б) Последовательности тРНК и аналогичные последовательности РНК, кодируемые в геномном контексте БГК пурамициноподобных вторичных метаболитов

6. Метаболизма штамма *Streptomyces* sp. Ac-502

Для определения точного продукта биосинтеза найденных пурамициноподобных биосинтетических генетических кластеров был осуществлен поиск таксономически родственных потенциальным продуцентам из рода *Streptomyces* штаммов во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (*S. albus*, *S. monomycini* и родственных *Streptomyces* sp.) и выявлен штамм-продуцент *Streptomyces* sp. VKM Ac-502, проявляющий выраженные антимикробные свойства. Согласно данным филогенетического анализа, штамм *Streptomyces* sp. VKM Ac-502 тесно связан с *S. monomycini* NRRL B-24309T, *S. ochraceiscleroticus* NRRL ISP-5594T и *S. violens* NRRL ISP-5597T, которые продуцируют антибиотик цистозин (Рис. 17). Культивирование родственного *S. monomycini* штамма *Streptomyces* sp. Ac-502 проводили в жидкой среде. Культуральная жидкость после ферментации подвергнута твердофазной экстракции и фракционированию по активности. Было обнаружено, что активный компонент имеет УФ-максимумы при 214 и 276 нм (Рис. 17). Данные ЯМР (Рис. 17Б) подтвердили, что выделенное соединение является аналогом пурамицина – цистозин (Cst).

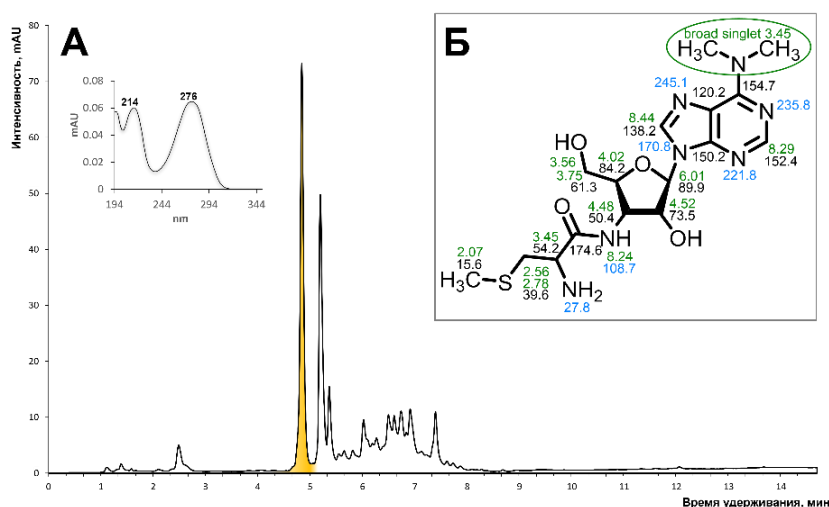


Рис. 17. (А) рр-ВЭЖХ активной фракции, активный компонент выделен желтым цветом. (Б) Структура цистозина с указанием химических сдвигов ЯМР в DMSO-d₆ при 35°C. Зелеными цифрами обозначены химические сдвиги ¹H, черными – ¹³C и синими – ¹⁵N

7. Анализ кластера цистоцина

Общая архитектура (Рис. 18) кластера *cst* была сопоставлена с уже известными пептидилнуклеозидными антибиотиками, в частности с пуромицином (Рис. 18). Биосинтетический генный кластер цистоцина содержит набор генов (*cstH*, *cstG*, *cstF*, *cstE*, *cstD*, *cstC*), гомологичных тем, которые участвуют в сборке нуклеозидной молекулы пуромицина в *pur* БГК (Рис. 18). Нуклеозидное звено аналогичного антибиотика, А201А, также собирается набором гомологичных ферментов (*ataP3/pur3*, *ataP4/pur4*, *ataP5/pur5*, *ataP7/pur7* и *ataP10/pur10*). Кроме того, недавно выделенный антибактериальный пролекарственный миметик GTP, ADG, обладает нуклеозидной природой. Его биосинтетический кластер генов включает гомологи генов *pur7*, *pur10*, *pur3* и *pur4*, что указывает на их участие в формировании нуклеозидного остова молекулы. Цистоцин и пуромицин имеют разный тип метилирования, S- и O-метилирование, соответственно. Следовательно, у *cst* БГК нет гомолога гена *dmpM*, который необходим для O-метилирования тирозина. Предполагается, что S-метилирование цистоцина опосредуется продуктом гена *cstA* – метилтрансферазой, которая демонстрирует низкую идентичность с O-метилтрансферазой *dmpM*.

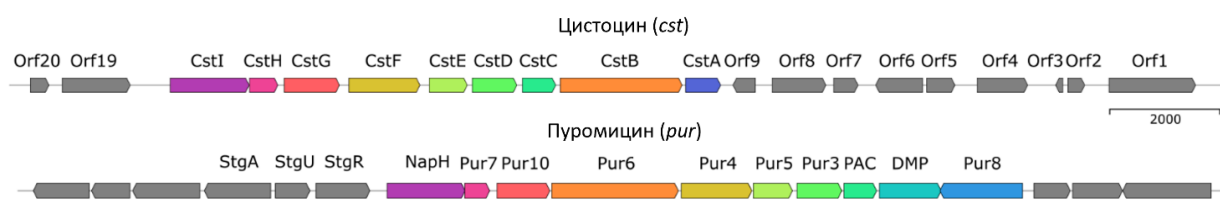


Рис. 18. Расширенный анализ биосинтетического генного кластера цистоцина и его сравнение с кластером пуромицина

8. Механизм собственной устойчивости продуцента цистоцина

Биосинтез цистоцина в целом аналогичен пуромицину (Рис. 19). В составе *cst* БГК идентифицирована N-ацетилтрансфераза *cstC* (Рис. 18), которая имеет заметное сходство (66%) с N-ацетилтрансферазой PAC пуромицина. Предполагается, что *cstC* также инактивирует цистоцин путем N-ацилирования. В свою очередь, *cstI* опосредует реактивацию цистоцина (Рис. 19), поскольку имеет умеренное сходство (54%) с NAPH пуромицина.

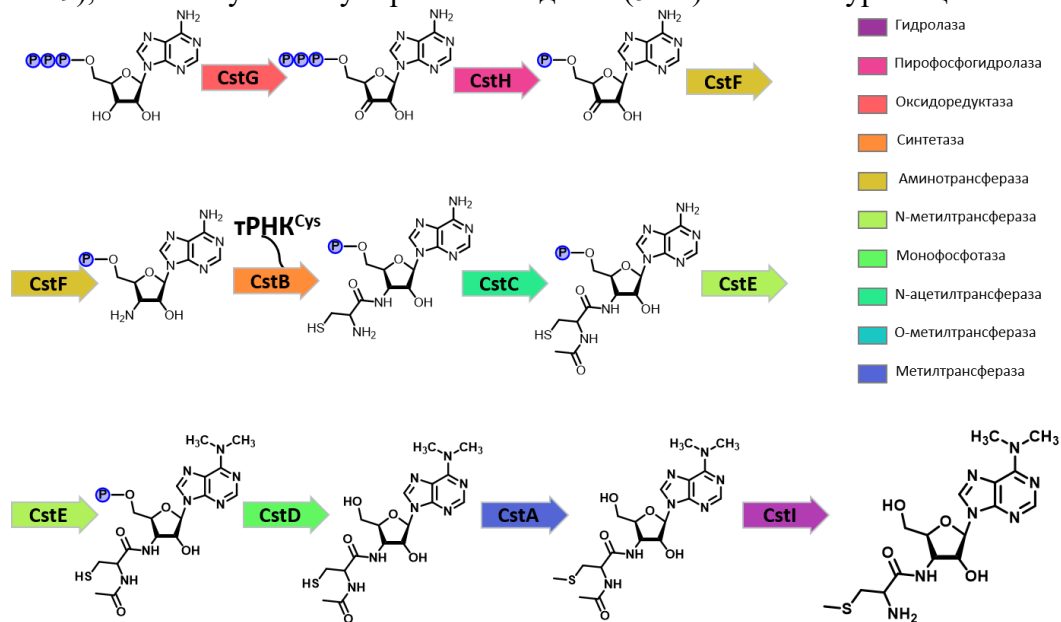


Рис. 19. Предполагаемый путь биосинтеза цистоцина

Модель структуры *cstC* AlfaFold 3 очень похожа на PAC, RMSD = 0.53Å. Две аминокислотные замены в модели *cstC*, A31F и L49F, были расположены на расстоянии менее 3Å и

1 Å от остатка О-метилтирозина пурамицина, что привело к менее объемному активному сайту и стерическим препятствиям для пурамицина в *cstC* (Рис. 20А, Б). Стерическое препятствие в антибиотик-связывающем кармане приводит к тому, что *cstC* предпочитает цистоцин в качестве субстрата.

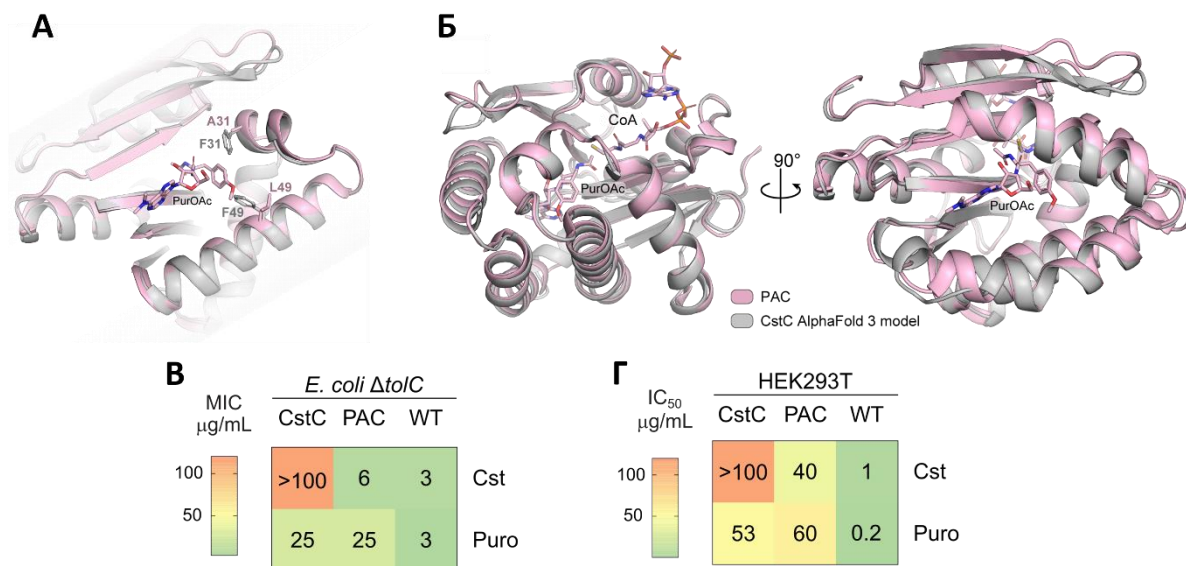


Рис. 20. *cstC* опосредует устойчивость к цистоцину. (А) Структурное выравнивание модели *cstC* AlphaFold 3 (серый) с комплексом PAC-PuroOAc-CoA (розовый), PDB ID 7K0A. (Б) Антибиотик-связывающий карман *cstC* и PAC; 31 и 49 позиции, расположенные вблизи аминокислотного остатка Puro-OAc, выделены палочками. (В) Сравнение восприимчивости бактерий *E. coli* $\Delta tolC$ и *E. coli* $\Delta tolC$, продуцирующих *cstC* или PAC. (Г) Цитотоксичность Cst и Puro по отношению к человеческой клеточной линии HEK293T и HEK293T, продуцирующей *cstC* или PAC

Рекомбинантная продукция *cstC* в *E. coli* $\Delta tolC$ опосредует ее устойчивость к цистоцину, увеличивая значения МИК более чем в 16 раз (Рис. 20В). Она также обеспечивает частичную устойчивость к пурамицину. Напротив, рекомбинантная продукция фермента PAC не влияет на устойчивость *E. coli* $\Delta tolC$ к цистоцину, делая бактерии устойчивыми к пурамицину (Рис. 20В). Еще более высокая устойчивость наблюдалась у N-ацетилтрансфераз, продуцирующихся клетками млекопитающих (Рис. 20Г). Клетки, продуцирующие PAC, были устойчивы как к цистоцину, так и к пурамицину, хотя приобретенная резистентность была выше для пурамицина, чем для цистоцина. *cstC*-продуцирующие клетки, в свою очередь, приобрели более высокую устойчивость к цистоцину (Рис. 20В, Г).

Таким образом биосинтез аминоклеточных антибиотиков включает специфический механизм саморезистентности, такой как N-ацетилирование полученного антибиотика, делающее его неактивным в организме-продуценте. Системы селекции клеточных линий на основе пурамицина используют этот механизм резистентности. БГК *cst* содержит N-ацетилтрансферазу CstC с аналогичной функцией. Специфичность CstC отличается от таковой для фермента PAC. Анализ на восприимчивость показал, что и CstC, и PAC обеспечивают определенный уровень перекрестной резистентности. Однако приобретенная резистентность значительно выше к соответствующему аминоклеточному. Этот эффект обусловлен наличием громоздких заместителей в непосредственной близости от каталитического центра CstC, что делает его менее пространственно доступным для Puro. Это открытие может послужить основой для рационального конструирования ферментов селективной устойчивости с целью создания систем селекции, ортогональных системам на основе пурамицина.

ВЫВОДЫ

1. Установлена продукция циклоспоринов грибом морского происхождения *Tolypocladium inflatum*. Разработан способ масс-спектрометрической идентификации циклоспорина А в присутствии изоциклоспорина А.

2. Показано, что антифунгальные свойства штамма *Streptomyces albidoflavus* A10, ассоциированного с муравьями древоточцами (*Comptonatus vagus*), опосредованы продукцией антибиотиков семейства антимитицинов.

3. Детализирован состав культивируемой фракции назальной микробиоты венгерской домашней свиньи (*Sus domesticus*). Антимикробная активность была ассоциирована с наличием штамма *Pseudomonas aeruginosa* SM-11, способного к индуцированной продукции антибиотика пиоцианина.

4. С использованием методов геномного майнинга идентифицирован штамм *Streptomyces* sp. VKM Ac-502, несущий ранее не описанный кластер биосинтеза аминонуклеозидного антибиотика цистоцина. Показано, что механизм ингибирования биосинтеза белка цистоцином происходит в результате цистоцинирования растущей полипептидной цепи. Детализирован механизм биосинтеза и механизм резистентности к цистоцину.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Baranova, A.A.**; Zakalyukina, Y.V.; Tyurin, A.P.; Korshun, V.A.; Belozerova, O.A.; Biryukov, M.V.; Moiseenko, A.V.; Terekhov, S.S.; Alferova, V.A. (2024). Antimicrobial Metabolites from Pig Nasal Microbiota. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 50, 354–374.
2. **Baranova, A.A.**, Chistov, A.A., Shuvalov, M.V., Tyurin, A.P., Biryukov, M.V., Ivanov, I.A., Sadykova, V.S., Kurakov, A.V., Sergeeva, A.I., Korshun, V.A., Alferova V.A. (2021). Identification of isocyclosporins by collision-induced dissociation of doubly protonated species. *Talanta* 225.
3. **Baranova, A.A.**, Chistov, A.A., Tyurin, A.P., Prokhorenko, I.A., Korshun, V.A., Biryukov, M.V., Alferova, V.A., Zakalyukina, Y.V. (2020). Chemical Ecology of *Streptomyces albidoflavus* Strain A10 Associated with Carpenter Ant *Camponotus vagus*. *Microorganisms* 8, 1948.
4. Alferova, V.A.; Zotova, P.A.; **Baranova, A.A.**; Guglya, E.B.; Belozerova, O.A.; Pipiya, S.O.; Kudzhaev, A.M.; Logunov, S.E.; Prokopenko, Y.A.; Marenkova, E.A.; et al. Mining Translation Inhibitors by a Unique Peptidyl-Aminonucleoside Synthetase Reveals Cystocin Biosynthesis and Self-Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* (2024), 25, 12901.
5. **Baranova, A.A.**, Alferova, V.A., Korshun, V.A., and Tyurin, A.P. (2020). Antibiotics from Extremophilic Micromycetes. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 46, 903–971.
6. **Baranova, A.A.**, Zakalyukina, Y.V., Ovcharenko, A.A., Korshun, V.A., Tyurin, A.P. (2022). Antibiotics from Insect-Associated Actinobacteria. *Biology* 11, 1676.
7. **Baranova, A.A.**; Alferova, V.A.; Korshun, V.A.; Tyurin, A.P. (2023) Modern Trends in Natural Antibiotic Discovery. *Life* 13, 1073.

Патенты РФ на изобретения

1. **Баранова А.А.**, Алферова В.А., Тюрин А.П., Чистов А.А., Колесанова Е.Ф., Коршун В.А. Способ масс-спектрометрического анализа циклоспоринов. RU 2767432C1, 2021.

Тезисы конференций и симпозиумов

1. **Баранова А.А.**, Алферова В.А., Коршун В.А., Чистов А.А., Бирюков М.В., Иванов И.А., Тюрин А.П. Масс-спектрометрический анализ циклоспорина А и продукта N→O-ацильного сдвига. VI Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», Нижний Новгород, Россия, 2020, с. 8.
2. **Baranova A.**, Alferova V., Tyurin A., Chistov A., Biryukov M., Ivanov I., Korshun V. Mass spectrometric method for analysis of cyclosporin A and isocyclosporin A. *FEBS open bio*, Любляна, Словения, 2021, 11 (S1), p 312.
3. **А.А. Баранова**, В.А. Алферова, А.П. Тюрин, А.А. Чистов, В.А. Коршун, М.В. Бирюков, Ю.В. Закалюкина Химическое многообразие антимицинов, продуцируемых штаммом *Streptomyces albidiflavus* A10, ассоциированным с муравьями-древоточцами *Camponotus vagus*. VII Съезда биохимиков и молекулярных биологов России и X Российского симпозиума «Белки и пептиды», Сочи – Дагомыс, Россия, 2021 с. 48-49.
4. **Anna Baranova**, Vera Alferova, Yuliya Zakalyukina, Vladimir Korshun Study of the biodiversity and antibiotic activity of microorganisms isolated from the nasal mucosa of the Mangalica pig. The 2nd International Electronic Conference on Antibiotics Drugs for Superbugs: Antibiotic Discovery, Modes of Action And Mechanisms of Resistance, 2022, <https://doi.org/10.3390/eca2022-12698>
5. **Баранова А.А.**, Закалюкина Ю.В., Тюрин А.П., Коршун В.В., Белозерова О.А., Бирюков М.В., Терехов С.С., Алферова В.А. Биотехнологический потенциал микробиоты слизистой носа венгерской домашней свиньи. VIII Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» Санкт-Петербург, Россия, 2023, с. 170.