

На правах рукописи



Назаров Антон Сергеевич

Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов
ультравысокопроизводительного скрининга

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

1.5.6. - Биотехнология

Москва - 2021

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Неуклонный рост числа случаев возникновения резистентности у бактерий привел к необходимости получения новых антибиотиков. Большинство используемых в современной медицинской практике антибиотиков относятся к большой группе разнородных по своей химической структуре соединений – вторичных метаболитов, полученных с использованием классических микробиологических подходов, которые основаны на культивации отдельных штаммов и анализе их противомикробной активности. Тем не менее такой метод на сегодняшний день стал неэффективным, так как часто приводит к переоткрытию одних и тех же легко культивируемых бактерий, и соответственно переоткрытию тех же самых антибиотиков. Альтернативные методы основаны на высокопроизводительном секвенировании и биоинформатическом анализе. Они позволяют с высокой производительностью находить новые кластеры генов биосинтеза антибиотиков *in silico*. Однако необходимость проводить клонирование и гетерологическую экспрессию кластеров генов биосинтеза значительно замедляет исследования, не гарантируя при этом наличие биологической активности нового вещества.

Уникальные возможности для поиска новых антимикробных препаратов открывает ультравысокопроизводительный микрофлюидный скрининг, который позволяет изолировать и анализировать функциональную активность отдельных объектов целых микробиомов, обеспечивая прямую связь между генотипом и фенотипом микроорганизма. Универсальность данной платформы позволяет также проводить скрининг разнообразных источников микробиоты, в том числе таких экзотических как слюна диких животных. Таким образом, ультравысокопроизводительный микрофлюидный скрининг образцов экзотической микробиоты способен решить проблему «пробела в открытии» новых антибиотических препаратов за счет скрининга редких, а также ранее не исследованных источников микробиоты, тем самым повышая шанс идентифицировать новое антибиотическое соединение среди вторичных метаболитов бактерий.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлся поиск новых биологически активных соединений с помощью ультравысокопроизводительного скрининга.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- Провести скрининг микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris* с помощью ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы.
- Идентифицировать микроорганизмы, продуцирующие антибактериальные соединения.
- Идентифицировать основные антимикробные агенты и исследовать их метаболизм.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе был впервые проведен скрининг микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris* с помощью ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы и обнаружен штамм *Bacillus pumilus* 124, который проявлял наибольшую антимикробную активность по отношению к патогенной бактерии *S. aureus* благодаря продукции антибиотика амикумацина (Ami). Также нами была разработана платформа глубокого функционального профилирования бактериального сообщества, позволяющая осуществлять персонафицированный скрининг антибиотикорезистентности. Разработанная платформа позволила детализировать спектр активности Ami для отдельных клеток микробиоты.

С помощью биоинформатических методов анализа генома нами был идентифицирован кластер генов биосинтеза Ami, а также определены ранее не охарактеризованные ферменты AmiN и AmiO, которые участвуют в метаболизме амикумацина в бактериальной клетке. Биологическая активность данных ферментов была подтверждена с помощью методов молекулярного клонирования, экспрессии белков и гетерологической продукции. Показано, что киназа AmiN инактивирует Ami в результате его фосфорилирования, в то время как фосфатаза AmiO участвует в последующей реактивации Ami дефосфорилируя фосфопроизводное Ami. На основании данных о гомологии было открыто новое подсемейство AmiN-подобных киназ суперсемейства аминокликозид фосфотрансфераз (APH), обеспечивающих резистентность к Ami. Было проведено биохимическое, кинетическое и структурное исследование киназы AmiN, а также молекулярное моделирование процесса фосфорилирования Ami.

В результате настоящей работы можно заключить, что ультравысокопроизводительная микрофлюидная платформа является высокоэффективным инструментом поиска новых антимикробных соединений среди представителей различных экзотических бактериальных сообществ. Глубокое функциональное профилирование таких образцов микробиоты дает важные данные о новых механизмах резистентности, а также механизмов продукции вторичных метаболитов бактериальными клетками. Таким образом разработанные нами подходы к анализу сложных гетерогенных популяций микроорганизмов в совокупности составляют новую высокотехнологичную методику поиска новых антимикробных соединений, необходимую для современной медицины, в которой с начала 1980-х годов заметно снижение числа новых эффективных антибиотиков. Микрофлюидная ультравысокопроизводительная

платформа является жизненно необходимым инструментом поиска антибиотиков, способных противостоять быстро распространяющимся мультирезистентным бактериям.

Публикации и апробация работы. По теме работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в список ВАК, имеется 1 патент. Результаты работы были представлены на 3 конференциях: 43-й конгресс FEBS (2018, Prague, Czech Republic), XXXIII зимняя молодежная научная школа (2020, Москва, Россия), 45-й конгресс FEBS (2021, Slovenia, Ljubljana).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Материал иллюстрирован 40 рисунками и 3 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 102 цитированные работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Скрининг микробиоты с целью идентификации штаммов, проявляющих антимикробную активность

Нами был проведен скрининг микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris* (рис. 1) с помощью микрофлюидной ультравысокопроизводительной платформы. Данный подход основан на инкапсуляции отдельных клеток микробиоты с репортерными патогенными бактериями *S. aureus*, продуцирующими GFP, в биосовместимых каплях MDE. В результате кокультивации бактерий в каплях возникает субпопуляция капель с низким уровнем флуоресценции репортера, в которых происходит ингибирование роста патогенных бактерий под воздействием клеток микробиоты.

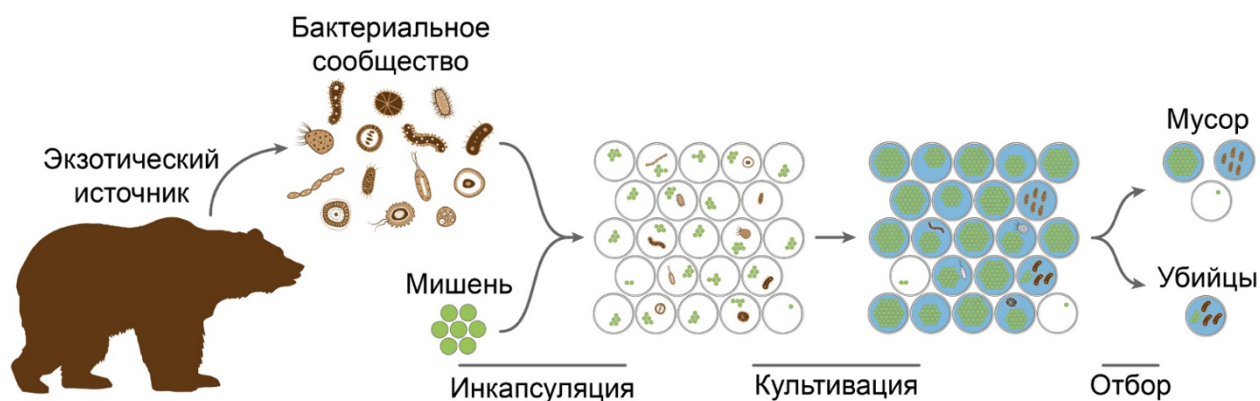


Рисунок 1. Схема идентификации бактерий из микробиоты ротовой полости сибирского медведя, проявляющих антимикробную активность против бактерии-мишени *S. aureus*, с использованием ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы

После чего эти капли отбираются с помощью технологии FACS на основании комбинации трех независимых флуоресцентных сигналов. Изолированные капли должны были одновременно показывать высокую начальную загрузку в капли бактерий *S. aureus* и низкую зеленую флуоресценцию *S. aureus* после совместного культивирования в каплях, а также демонстрировать высокую метаболическую активность живых клеток. Отобранные таким образом капли высевались на твердую питательную среду для разрушения капель и регенерации бактериальных клонов.

В результате скрининга был идентифицирован ряд микроорганизмов, ингибирующих рост патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* в биосовместимых каплях двойной эмульсии. В дальнейшем исследование будет сосредоточено на штамме *B. pumilus* 124, так как он проявил наиболее выраженные антибактериальные свойства.

Исследование антимикробной активности штамма *B. pumilus* 124

Изолированный с помощью ультравысокопроизводительного микрофлюидного скрининга штамм *B. pumilus* 124 был исследован с целью идентификации биологически активных метаболитов. С помощью фракционирования питательной среды после культивации в ней штамма *B. pumilus* 124 методом ОФ-ВЭЖХ мы установили, что антимикробная активность обусловлена продукцией антибиотика амикумацина (Ami).

Для оценки антибактериального потенциала Ami были подобраны условия культивации для максимальной продукции антибиотика. Было показано, что использование среды SYC, содержащей микрочастицы карбоната кальция, обеспечивает увеличение продукции Ami более чем в 8 раз, по сравнению с культивацией в среде 2YT. Выделение и очистка Ami из культуральной среды осуществляется с помощью твердофазной экстракции на сорбенте, модифицированном полидивинилбензолом (LPS-500, Техносорбент, Россия), и двумя стадиями ОФ-ВЭЖХ на Symmetry C18 сорбенте (Waters, США) (рис. 2).

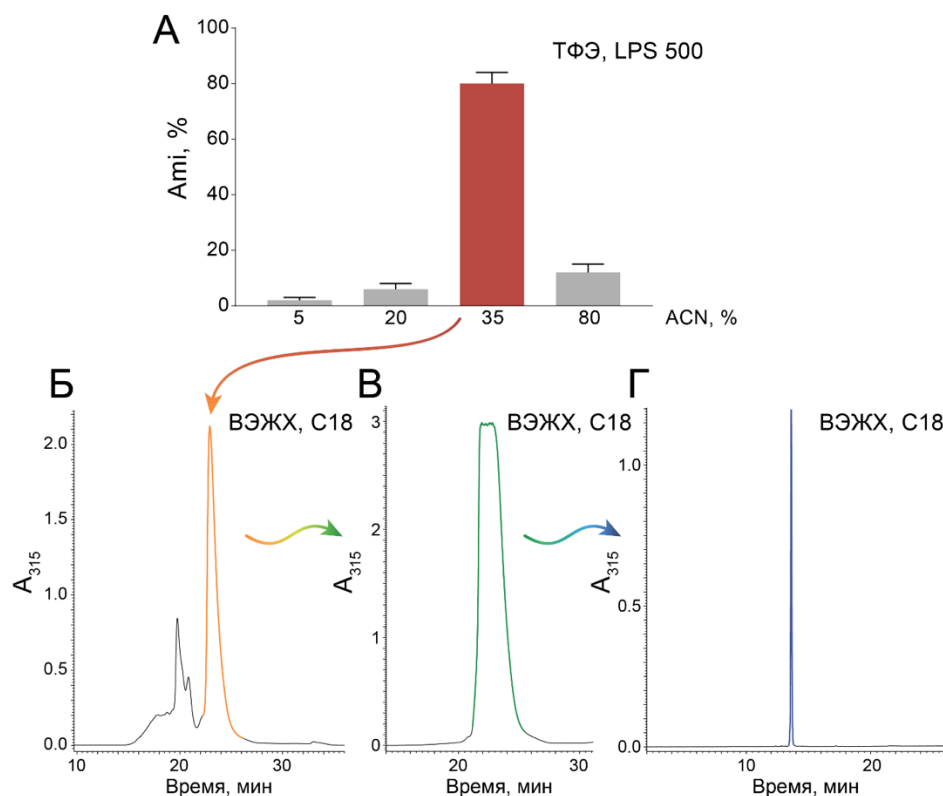


Рисунок 2. Оптимизированный процесс очистки Ami. **А.** Стадия твердофазной экстракции (ТФЭ). Элюция проводилась с применением ступенчатого градиента. **Б, В.** Хроматограммы последовательных стадии очистки фракций, содержащих Ami, с помощью ОФ-ВЭЖХ. **Г.** Хроматограмма образца очищенного препарата Ami

Для исследования спектра активности Ami была разработана технология глубокого функционального профилирования, позволяющая персонафицировано определять

чувствительность разнообразных компонентов микробиоты к антибиотику. В основе технологии лежит культивирование индивидуальных бактерий в каплях в присутствии различных концентраций антибиотика, после чего проводится отбор с помощью FACS капель с живыми бактериями с их последующим метагеномным секвенированием. Биоинформатический анализ данных секвенирования позволяет определять изменение видового состава образцов под действием варьирующихся концентраций антибиотика. Таким образом данная технология позволяет количественно определять минимальную ингибирующую концентрацию для отдельных представителей микробиоты (рис. 3).

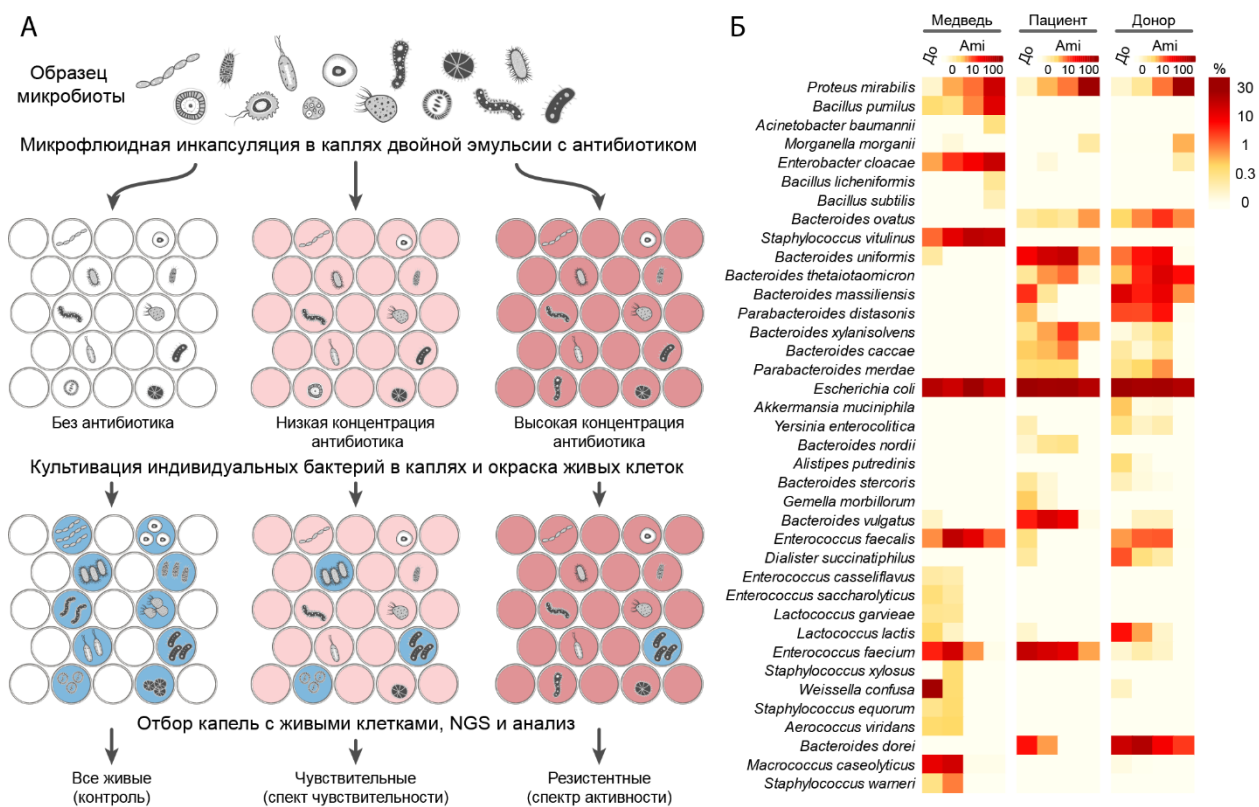


Рисунок 3. А. Иллюстрация принципа оценки спектра активности антибиотика с использованием высоко гетерогенной популяции бактерий и технологии глубокого функционального профилирования. **Б.** Тепловая карта иллюстрирует долю каждого вида бактерий в образце и ее изменение под действием амикумацина, а также влияние Ami на различные образцы микробиоты: микробиота ротовой полости сибирского медведя (медведь), фекальная микробиота людей, больных колитом (пациент) и здоровых доноров (донор)

Скрининг активности амикумацина с помощью ультравысокопроизводительной платформы продемонстрировал увеличение частоты встречаемости одних штаммов бактерий и снижению частоты встречаемости других в условиях культивации в

присутствии антибиотика (рис. 4, А), что позволяет оценить чувствительность к Ам1 для каждой конкретной бактерии в конкретном образце микробиоты (рис. 4, Б).

Полученные таким методом данные согласуются с результатами *in vitro* исследования восприимчивости бактерий к Ам1. Мы обнаружили, что значения МИК для конкретного штамма, основанные на данных об изменении состава микробиоты после культивирования в каплях, согласуются со значениями МИК, измеренными для каждого конкретного штамма с помощью стандартного метода серийных разведений в планшетах (рис. 4, Б).

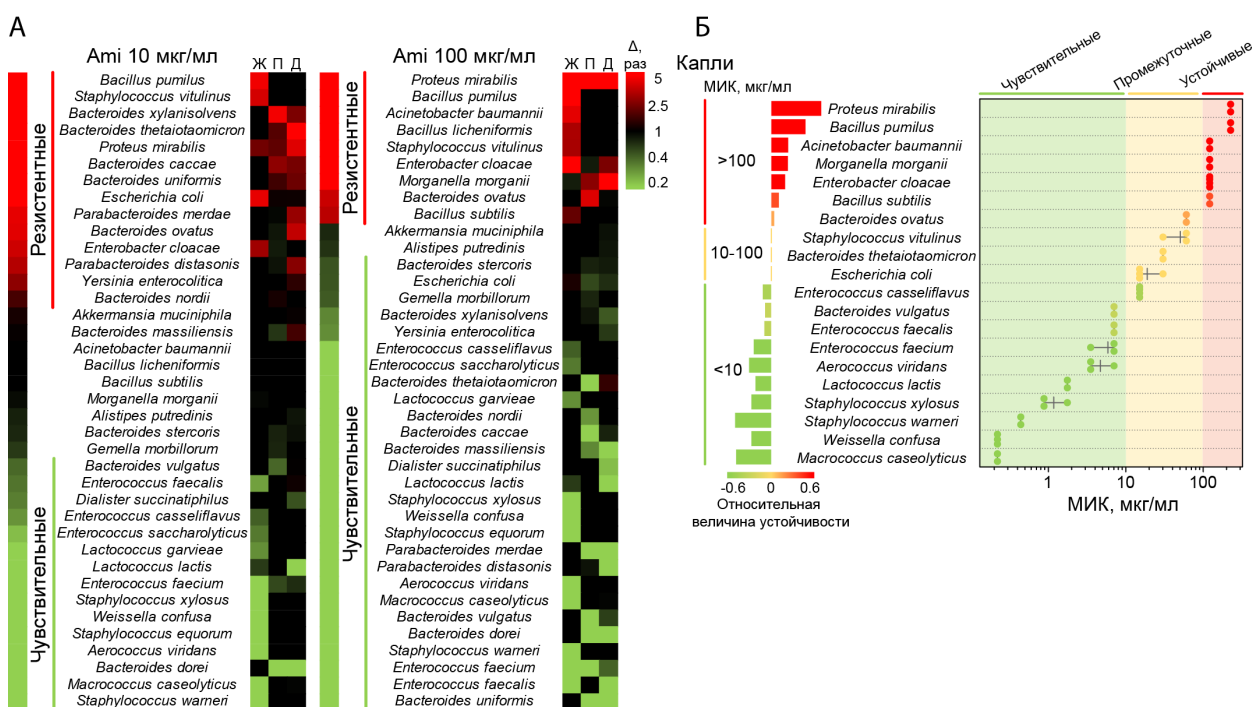


Рисунок 4. А. Тепловая карта, указывающая на изменение частоты встречаемости отдельных бактерий микробиоты после культивации в микрофлюидных каплях в присутствии 10 и 100 мкг/мл амикумадина по сравнению с культивацией без антибиотика. **Б.** Сравнение значений МИК, полученными с помощью разработанной микрофлюидной платформы (шкала слева) и значениями МИК клинических изолятов, измеренных *in vitro* с помощью классического метода серийных разведений (диаграмма справа)

В результате нам удалось детализировать спектр активности Ам1. Было показано, что Ам1 в первую очередь активен в отношении грамположительных бактерий, в том числе высокопатогенных штаммов бактерий, принадлежащих родам *Enterococcus* и *Staphylococcus*, таких как *E. faecium* и *S. aureus*. Данные виды входят в число возбудителей группы ESKAPE, представляющих высокую социальную значимость в виду частой встречаемости антибиотикорезистентных штаммов. При этом амикумадин проявляет

сниженную эффективность против грамотрицательных бактерий, сохраняя при этом активность в отношении некоторых штаммов, таких как *E. coli*.

Анализ кластера генов биосинтеза амикумацина

Для идентификации механизма биосинтеза Ам₁ мы провели полногеномное секвенирование штамма *B. pumilus* 124 и идентифицировали кластер генов биосинтеза Ам₁. Помимо этого, мы обнаружили кластеры генов биосинтеза в составе геномов близкородственных *B. pumilus* 124 бактерий, гомологичные кластеру генов биосинтеза Ам₁. Для некоторых таких гомологичных кластеров генов были описаны продукты биосинтеза – антибиотики: цвиттермицин, паениламицин, ксенокумацин и колибактин (рис. 5).

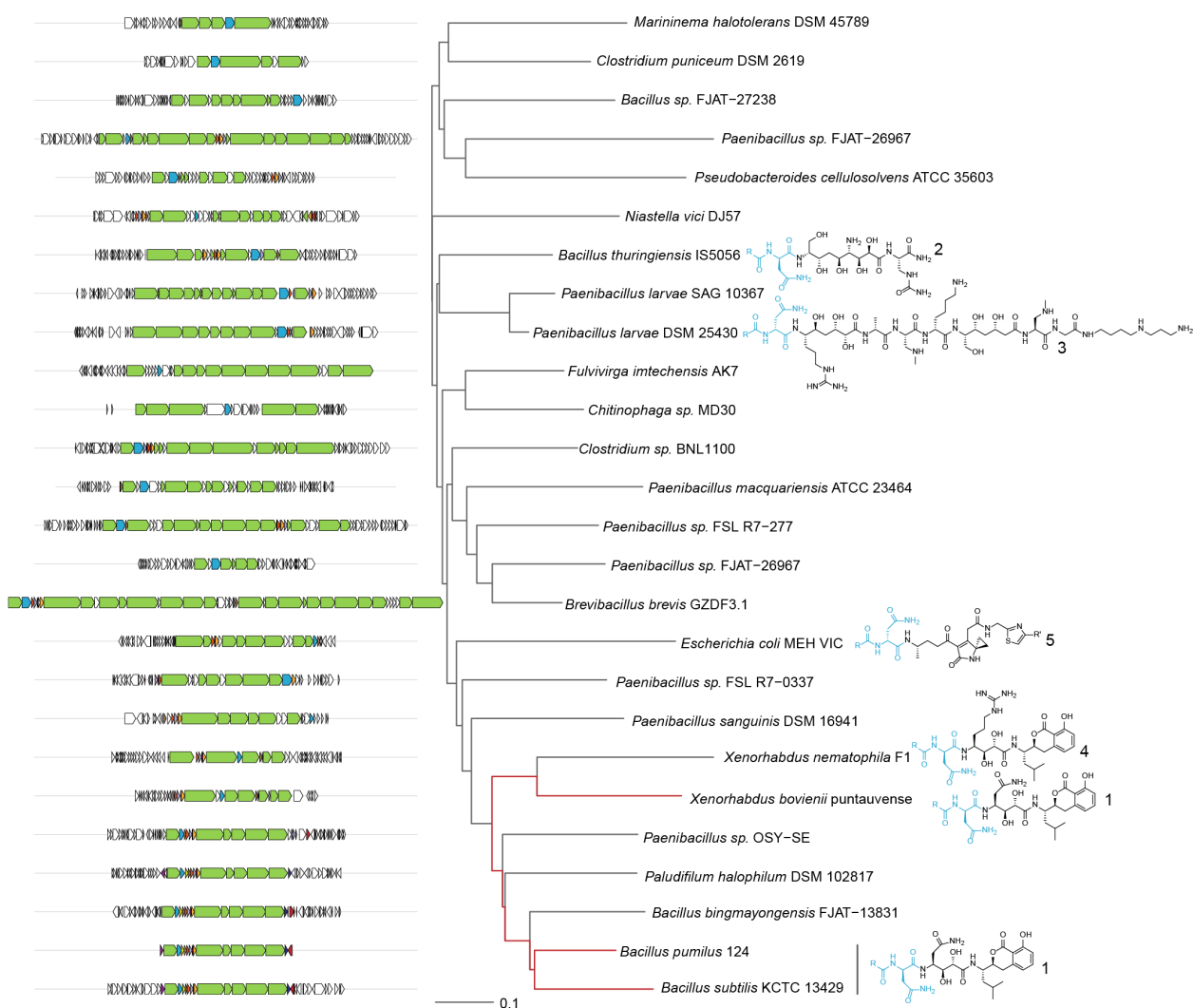


Рисунок 5. Кластеры генов биосинтеза, гомологичные кластеру Ам₁, идентифицированные с помощью биоинформатического анализа генома. Ключевые гены кластеров обозначены зеленым цветом, а пептидазы, активирующие молекулу-предшественник антибиотика синим цветом. Известные продукты кластеров генов биосинтеза представлены в виде молекул-предшественников, которые затем активируются путем отщепления N-Ацил-D-

Асн (обозначен синим цветом; R - остаток жирной кислоты). Молекулы-предшественники: 1 - амикумацин А; 2 - цвиттермицин А; 3 - паениламицин В1; 4 - ксенокумацин 1; 5 - колибактин

Анализируя архитектуру кластера генов биосинтеза Аmі, мы обнаружили в непосредственной близости к ключевым генам биосинтеза Аmі открытые рамки считывания, кодирующие ферменты с неизвестными функциями, которые аннотировались как предполагаемые киназа АmіN и фосфатаза АmіO (рис. 6, А).

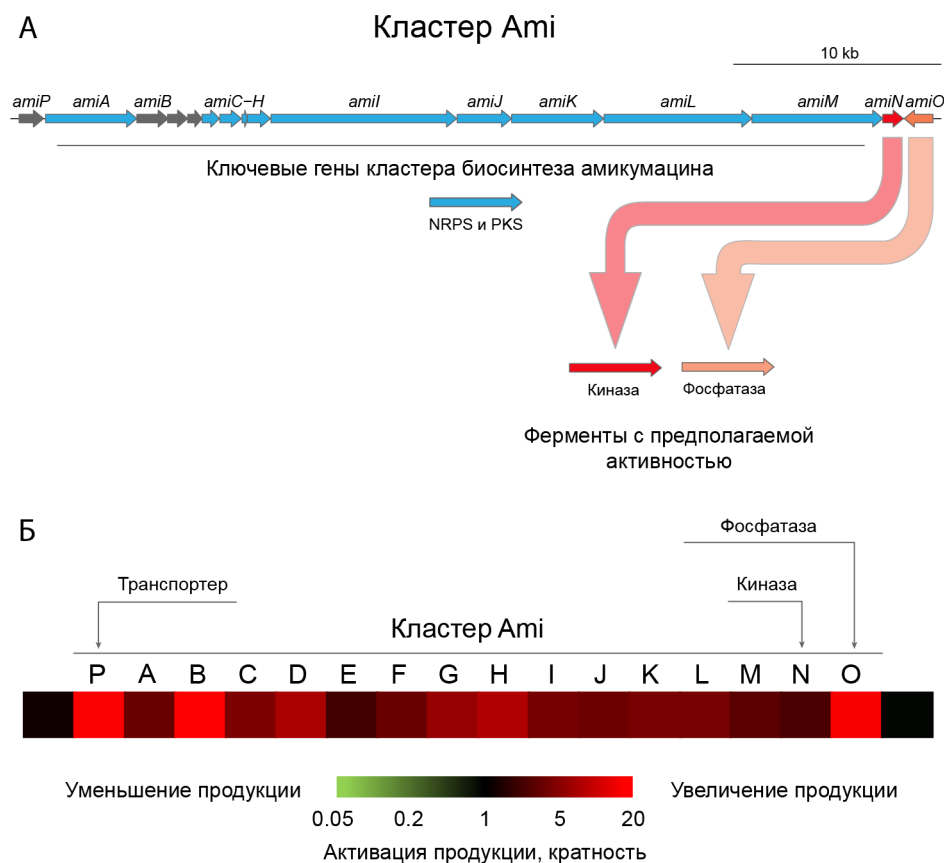


Рисунок 6. А. Архитектура кластера генов биосинтеза Аmі. **Б.** Сравнительный протеомный анализ штамма *B. pumilus* 124 в состояниях активной и сниженной продукции Аmі. Дифференциальный профиль продукции белков кластера генов биосинтеза, цветовая шкала показывает относительное снижение или увеличение продукции конкретных белков в состоянии активной продукции Аmі

Для выявления механизма регуляции продукции Аmі и подтверждения границ кластера генов биосинтеза мы провели дифференциальный протеомный анализ штамма *B. pumilus* 124 в состояниях активной и значительно сниженной продукции амикумацина. Нами были установлены границы кластера генов биосинтеза, а также было отмечено увеличение продукции не только описанных ранее ферментов биосинтеза амикумацина, например протеазы АmіВ, активирующей молекулу-предшественник антибиотика, но и

других не охарактеризованных ранее белков, таких как транспортёр AmiP и фосфатаза AmiO (рис. 6, Б). Таким образом мы предположили, что активация продукции связана с регуляцией фосфорилирования амикумацина в клетках.

Метаболомный анализ культуральной среды и клеточных лизатов штамма *B. pumilus* 124 показал присутствие в клеточных лизатах фосфорилированного Ami, который не проявлял антибиотической активности, в то время как во внешней среде присутствовало только активное дефосфорилированное производное Ami (рис. 7, А). Данный сравнительный анализ показал, что продукция Ami связана с его фосфорилированием внутри клетки киназой, обеспечивающей саморезистентность, в то время как дефосфорилирование Ami фосфатазой, по-видимому, сопряжено с процессом его секреции во внешнюю среду.

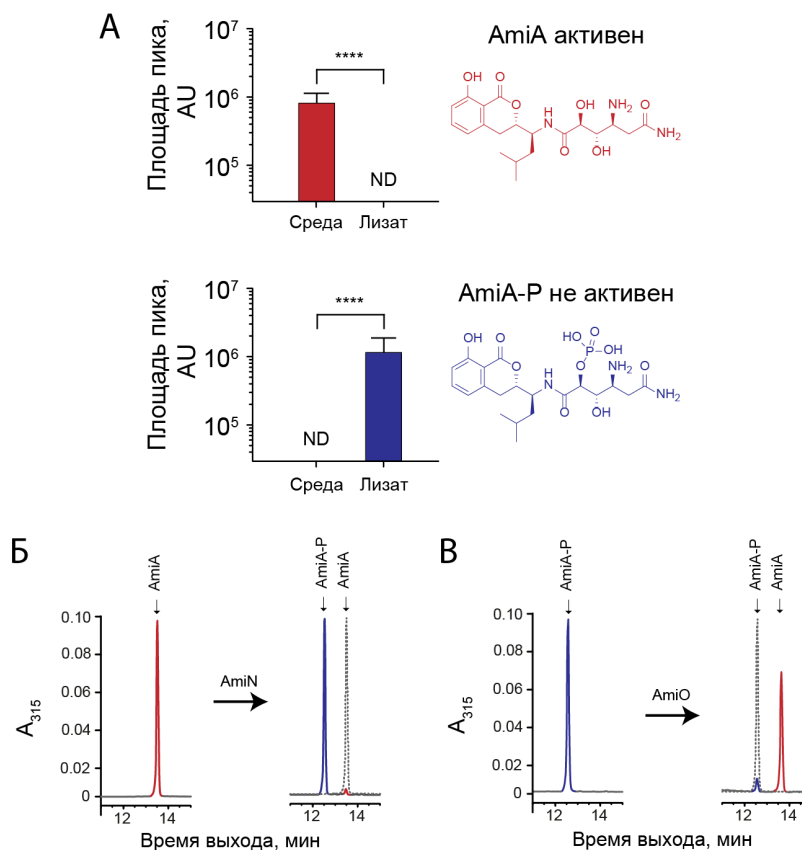


Рисунок 7. А. Сравнительный метаболомный анализ клеточных лизатов и культуральных сред после культивации штамма *B. pumilus* 124. $P < 0.0001$. **Б.** Фосфорилирование Ami киназой AmiN. **В.** Дефосфорилирование фосфорилированного Ami фосфатазой AmiO. Ami отмечен красным цветом. Фосфорилированный Ami (Ami-P) отмечен синим цветом.

Для подтверждения функциональной активности киназы AmiN и фосфатазы AmiO они были получены в виде рекомбинантных ферментов в клетках *E. coli*. Реконструкция реакции фосфорилирования и дефосфорилирования с использованием амикумацина и его

фосфопроизводного в качестве субстратов подтвердила функциональную активность киназы AmiN и фосфатазы AmiO в отношении амикумацина и его фосфопроизводного (рис. 7, Б и В). Киназа AmiN приводила к высокоэффективному фосфорилированию амикумацина, в то время как фосфатаза AmiO дефосфорилировала фосфопроизводное амикумацина.

Биологическая функция киназы AmiN и его гомологов hAmiN и YerI из не продуцирующих амикумацин штаммов *B. pumilus* 123 и *B. subtilis* 168 соответственно была подтверждена с помощью гетерологической продукции данных ферментов в прокариотических клетках *E. coli* и *B. subtilis*, а также клетках млекопитающих HEK293T.

Трансформация штамма *E. coli* BW25113 $\Delta tolC$ плазмидой, кодирующей киназу AmiN, обеспечила устойчивость к Ami рекомбинантного штамма (рис. 8). Поскольку штамм *B. subtilis* 168 имеет в своем геноме киназу YerI, гомологичную AmiN, которая обеспечивает данный штамм естественной резистентностью к амикумацину, то первоначально нами был получен делеционный мутант по гену данной киназы *B. subtilis* 168 $\Delta yerI$. Полученный штамм чувствителен к амикумацину (рис. 8), при этом его трансформация плазмидой, кодирующей AmiN, привела к восстановлению резистентности по отношению к Ami. Аналогично культуральные клетки HEK293T, изначально чувствительные к амикумацину, приобретали резистентность после трансфекции плазмидой, кодирующей киназу AmiN (рис. 8).

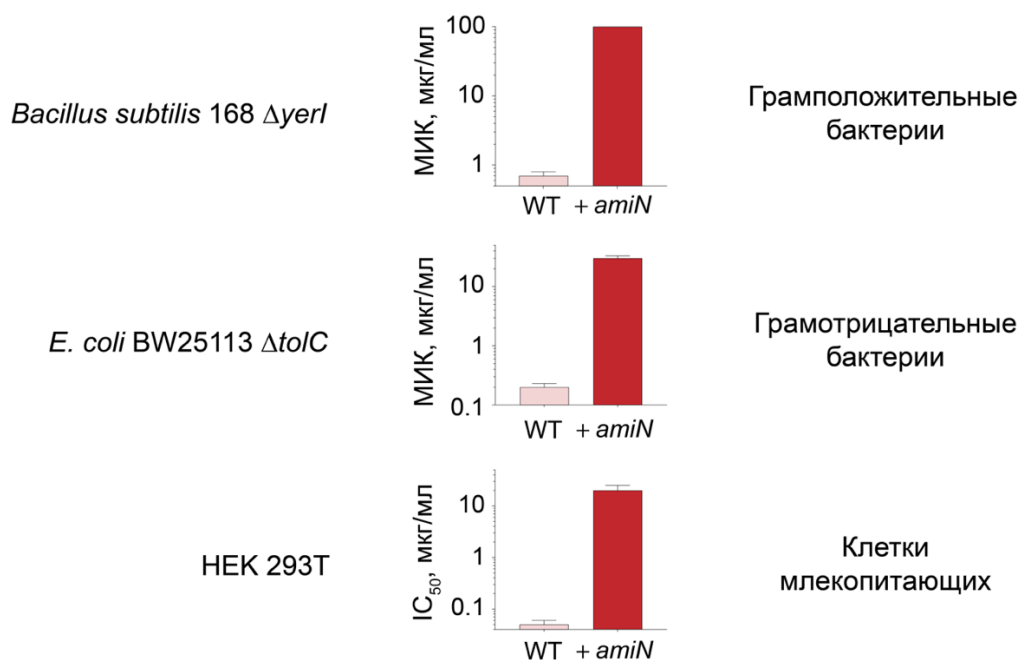


Рисунок 8. Влияние гетерологической экспрессии киназы AmiN на резистентность к амикумацину у модельных микроорганизмов. МИК и IC₅₀ измеряли в трех повторностях. Данные представляют собой среднее значение \pm SD

Таким образом, гетерологическая продукция AmiN обеспечивает резистентность грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также клеток млекопитающих к амикумацину.

Ферментативные свойства киназы AmiN

Для определения ферментативных характеристик AmiN мы исследовали кинетику реакции фосфорилирования амикумацина *in vitro*. Мы показали, что фосфорилирование Ami в условиях избытка концентрации АТФ и Mg²⁺ по отношению к субстрату подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 9, А).

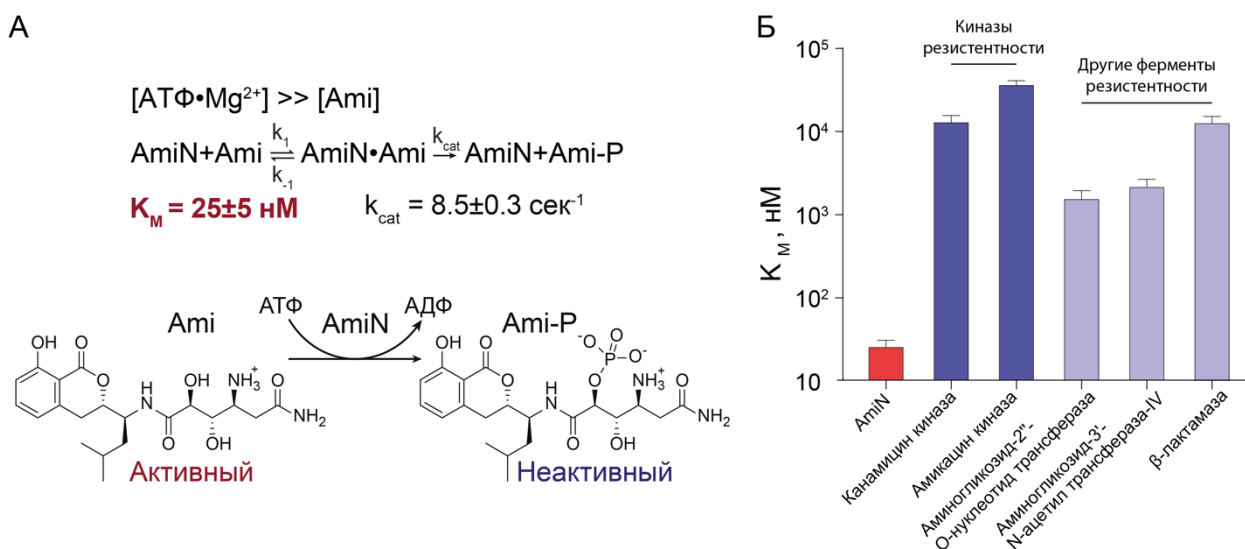


Рисунок 9. А. Измерение кинетических параметров реакции фосфорилирования Ami киназой AmiN в условиях избытка концентраций АТФ и Mg²⁺ по отношению к субстрату. Измеренные кинетические константы представлены в виде среднего значения \pm SD. **Б.** Сравнительная диаграмма констант Михаэлиса киназы AmiN и других ферментов резистентности. Константа Михаэлиса для киназы AmiN получена по результатам трех независимых экспериментов. Значения кинетических констант были взяты из литературных источников. Данные представляют среднее значение \pm SD

Полученные данные свидетельствуют о том, что AmiN имеет близкую к диффузионному пределу каталитическую эффективность $k_{cat}/K_M = 3.4 \pm 0.7 \times 10^8 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ по отношению к амикумацину, что характеризует AmiN как каталитически совершенный фермент резистентности. Такая необычайная каталитическая эффективность обусловлена чрезвычайно низкой константой Михаэлиса ($K_M = 25 \pm 5 \text{ нМ}$), что является уникальной характеристикой среди киназ антибиотиков, таких как канамицин киназа и амикацин киназа, и других ферментов резистентности, таких как аминогликозид-2''-О-нуклеотид-трансфераза, аминогликозид-3'-N-ацил-трансфераза и β-лактамаза (рис. 9, Б).

Измеренные нами кинетические константы согласуются с данными о эффективности связывания $K_d = 80 \pm 25$ нМ, полученными методом изотермической титрационной калориметрии для комплекса амикумацина с AmiN в присутствии негидролизуемого аналога АТФ – аденилимидодифосфата (AMP-PNP).

Мы показали, что AmiN представляет собой новый фермент резистентности, неактивный в отношении известных антибиотиков аминогликозидов, макролидов и тетрациклинов (рис. 10).

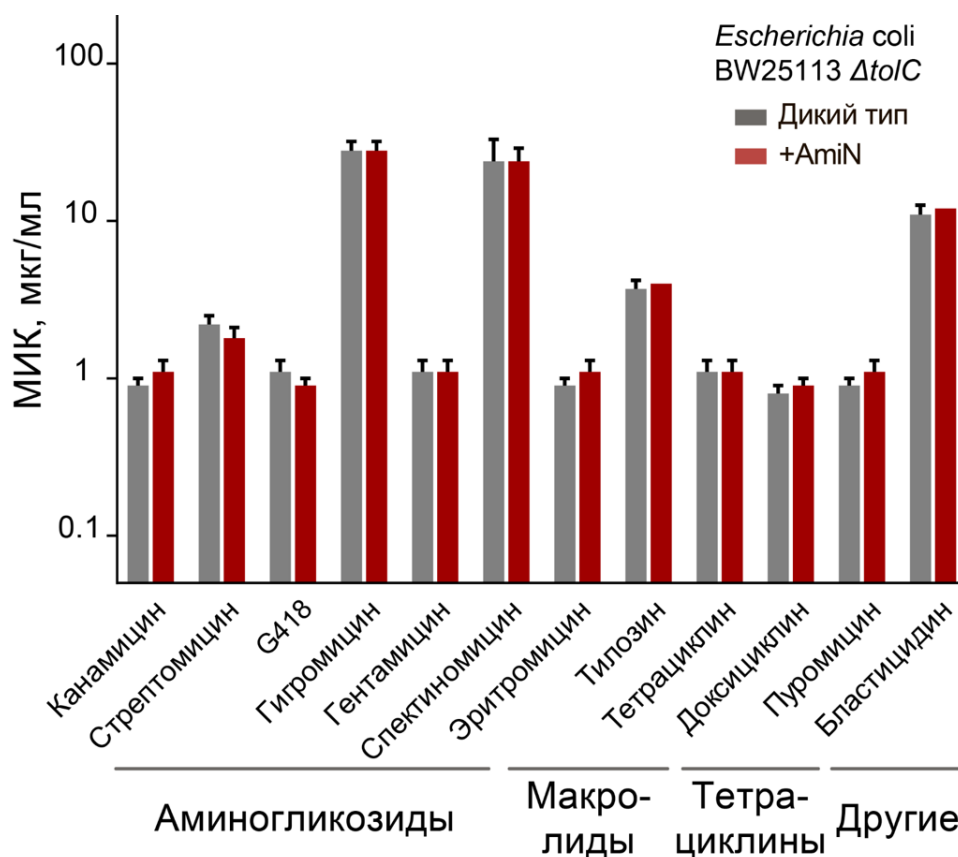


Рисунок 10. Влияние гетерологической экспрессии киназы AmiN на устойчивость к различным антибиотикам. Значения МИК были определены в трех независимых повторностях и проанализированы с помощью t-теста. Различия между штаммом дикого типа и трансформированного плазмидой, которая кодирует AmiN для всех протестированных антибиотиков были не достоверны. Данные представляют собой среднее значение \pm SD

Кроме того, активность AmiN и hAmiN по отношению к амикумацину, измеренная в условиях насыщения фермента субстратом, более чем на два порядка превышала активность по отношению к структурно родственными Ami соединениям и пептидомиметикам (рис. 11, А), что демонстрирует уникальную специфичность AmiN по отношению к своему природному субстрату. При этом скорость реакции $v/[E]$ была ниже

предела обнаружения $2 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ для N-ацетилглюкозамина, глюкозамин-6-фосфата, глюкозы, сахарозы, сорбита, глицерина, 2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол (Трис), серина, треонина, тирозина, основного белка миелина (МВР), пептидов YAS-NH₂, YLS-NH₂, YS-NH₂, PSW-NH₂, холина, аминометил-пропанола, 3-диметиламино-1-пропанола.

При этом необходимо отметить, что киназа hAmiN из штамма *B. pumilus* 123, в геноме которого отсутствует кластер генов биосинтеза Ami, обладает меньшей субстратной специфичностью по отношению к другим субстратам (рис. 11, А) по сравнению с AmiN.

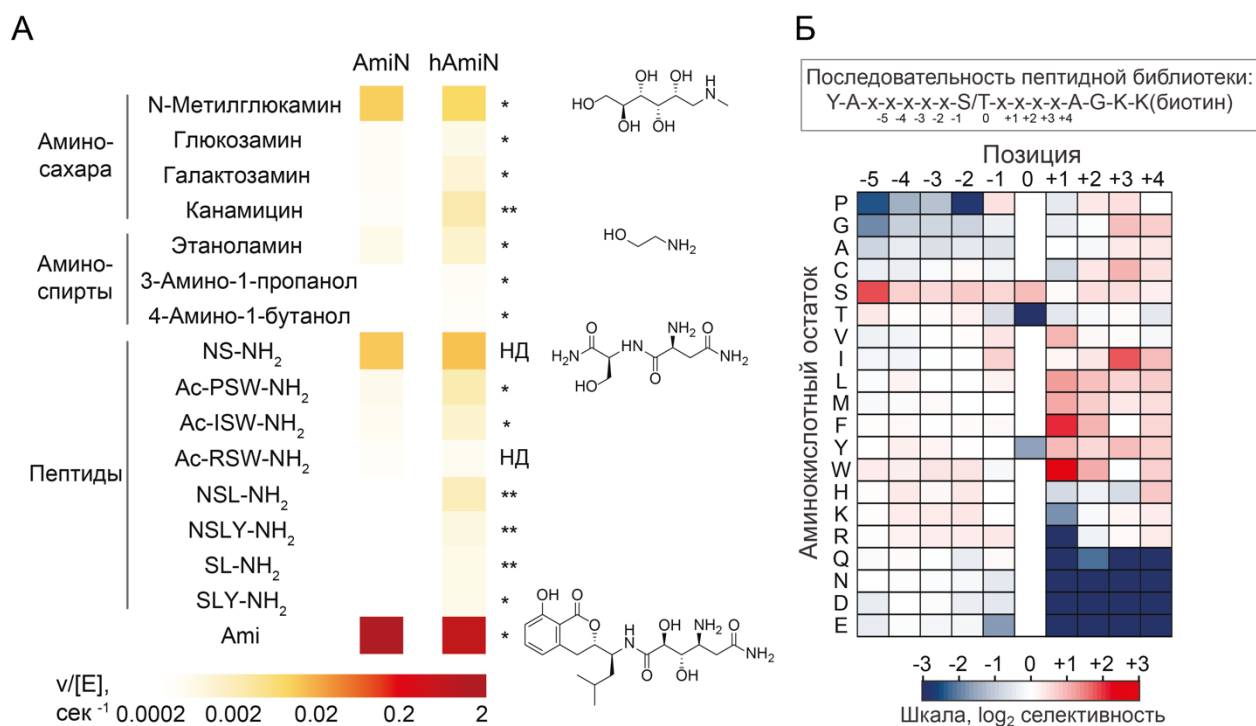


Рисунок 11. А. Специфичность киназ AmiN и hAmiN по отношению к различным субстратам и амикумацину. Скорости реакции определяли в трех независимых повторностях и проанализировали с помощью множественного t-критерия. ** P < 0.01, * P < 0.05, НД – нет достоверных различий. Статистический анализ характеризует степень различия в скорости реакции между AmiN и hAmiN для различных субстратов. **Б.** Анализ активности AmiN по отношению к библиотеке пептидов с использованием радиоактивно меченного АТФ. В тепловая карта показывает относительный уровень фосфорилирования каждого компонента библиотеки из 183 пептидов. В положении «х» конкретного пептида зафиксирована одна конкретная аминокислота, а в оставшихся восьми положениях представлена эквимольная смесь из 17 аминокислотных остатков кроме S, T и C. Эксперимент был проведен в трех биологических повторах

Для более глубокого понимания субстратной специфичности AmiN по отношению к полипептидам мы использовали комбинаторную пептидную библиотеку в качестве

субстратов в реакции фосфорилирования. Детекция даже минимальной киназной активности AmiN обеспечивалась благодаря использованию радиоактивно меченого [γ - ^{32}P]-АТФ.

Таким образом мы определили, что пептиды P/I/R-S-W и Y-A-S, имитирующие химическую структуру Ami, могут быть фосфорилированы киназой AmiN (рис. 11, Б). Однако протеинкиназная активность AmiN была более чем на два порядка ниже по сравнению с активностью по отношению к природному субстрату Ami (рис. 11, А).

Киназа AmiN и ее гомологи демонстрируют исключительные ферментативные характеристики и субстратную специфичность по отношению к природному субстрату Ami. На основании этих данных можно говорить о том, что гомологи киназы AmiN представляют обособленную группу киназ, отличающихся по многим показателям от других уже известных ферментов резистентности.

Анализ гомологов киназы AmiN

Для понимания эволюционного ландшафта и распространенности гомологов киназы AmiN мы провели филогенетический анализ данных ферментов и показали, что белки, гомологичные AmiN, принадлежат суперсемейству аминокликозид фосфотрансфераз, включающему в себя известные киназы резистентности - аминокликозидкиназы и макролидкиназы, образуя при этом подсемейство AmiN-подобных киназ (рис. 12, А и Б). В то же время в отличие от известных киназ антибиотиков AmiN-подобные киназы более близки малоизученным подсемействам аминокпропанолкиназ и предполагаемых Ser/Thr киназ с неизвестной ферментативной активностью.

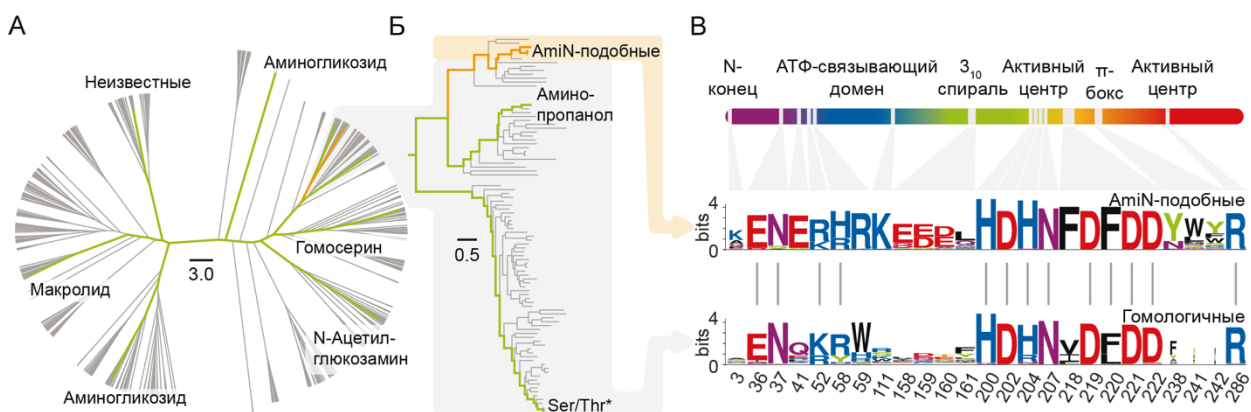


Рисунок 12. А, Б. Филогенетическое дерево AmiN-подобных киназ из суперсемейства аминокликозид фосфотрансфераз АРН. Известные структуры ранее изученных киназ и киназ AmiN/hAmiN показаны зелеными и оранжевыми линиями соответственно. В.

Логотип последовательности, иллюстрирующий консервативные аминокислотные остатки семейств AmiN-подобных, AP и Ser/Thr* подсемейств киназ (отмечены серыми линиями)

Множественное выравнивание последовательностей выявило ряд консервативных для киназ аминокислотных остатков, таких как E36, N37, K/R52, H/R58, фосфотрансферный мотив Бреннера (H200, D202 и N207), H204, сайт связывания металлов (D219, F220, D221 и D222) и R286 (рис. 12, В).

Также нам удалось выявить аминокислотные остатки, которые являются отличительными признаками AmiN-подобных фосфотрансфераз: E41, R59, K111, E158, F218. Помимо этого, был выявлен уникальный мотив, включающий остатки H204, H205, N238, W241 и Y242, который образует сайт связывания субстрата за счёт π - π взаимодействий, позже названный нами π -боксом (рис. 12, В).

Гомологи AmiN были обнаружены среди многих видов бактерий рода *Bacillus*, что подчеркивает функциональную значимость данных ферментов. Более того, мы обнаружили гомолог AmiN и гомологичный кластер биосинтеза амикумацина у термоактиномицета *Paludifilum halophilum*. Широкая распространенность гомологов киназы AmiN и её способность обеспечивать резистентность к амикумацину говорит о том, что антибиотик амикумацин и киназа резистентности AmiN играют важную роль в экологии микроорганизмов.

Исследование структурно-функциональных особенностей киназы AmiN

Для объяснения уникальных структурно-функциональных характеристик фермента AmiN мы изучили его структуру, а также структуру комплекса AmiN с АТФ и комплекса AmiN с негидролизуемым аналогом АТФ аденил-имидодифосфатом, Mg^{2+} и амикумацином. Было показано, что связывание амикумацина, но не АТФ, вызывает значительные конформационные перестройки AmiN, приводящие к образованию закрытой формы фермента (рис. 13, А, Б и В).

При этом закрытие фермента обеспечивает возможность протекания реакции переноса фосфата благодаря пространственному сближению остатка гамма-фосфата АТФ и гидроксильной группы амикумацина (рис. 13, В).

Благодаря разрешению кристаллической структуры AmiN мы идентифицировали общие структурные особенности с другими фосфотрансферазами - АТФ-связывающий домен, фосфотрансферный Бреннера мотив (H200, D202 и N207) и сайт связывания с металлом (рис. 13, Г). Кроме того, AmiN обладает рядом уникальных структурных мотивов,

отличающих её от других известных киназ. Уникальное связывание субстрата обусловлено наличием π -бокса. π -бокс представляет собой структуру, образующую сложную систему π - π взаимодействий между аминокислотными остатками H204, H205, N238, W241 и Y242 и изокумариновой группой амикумаина (рис. 13, Д).

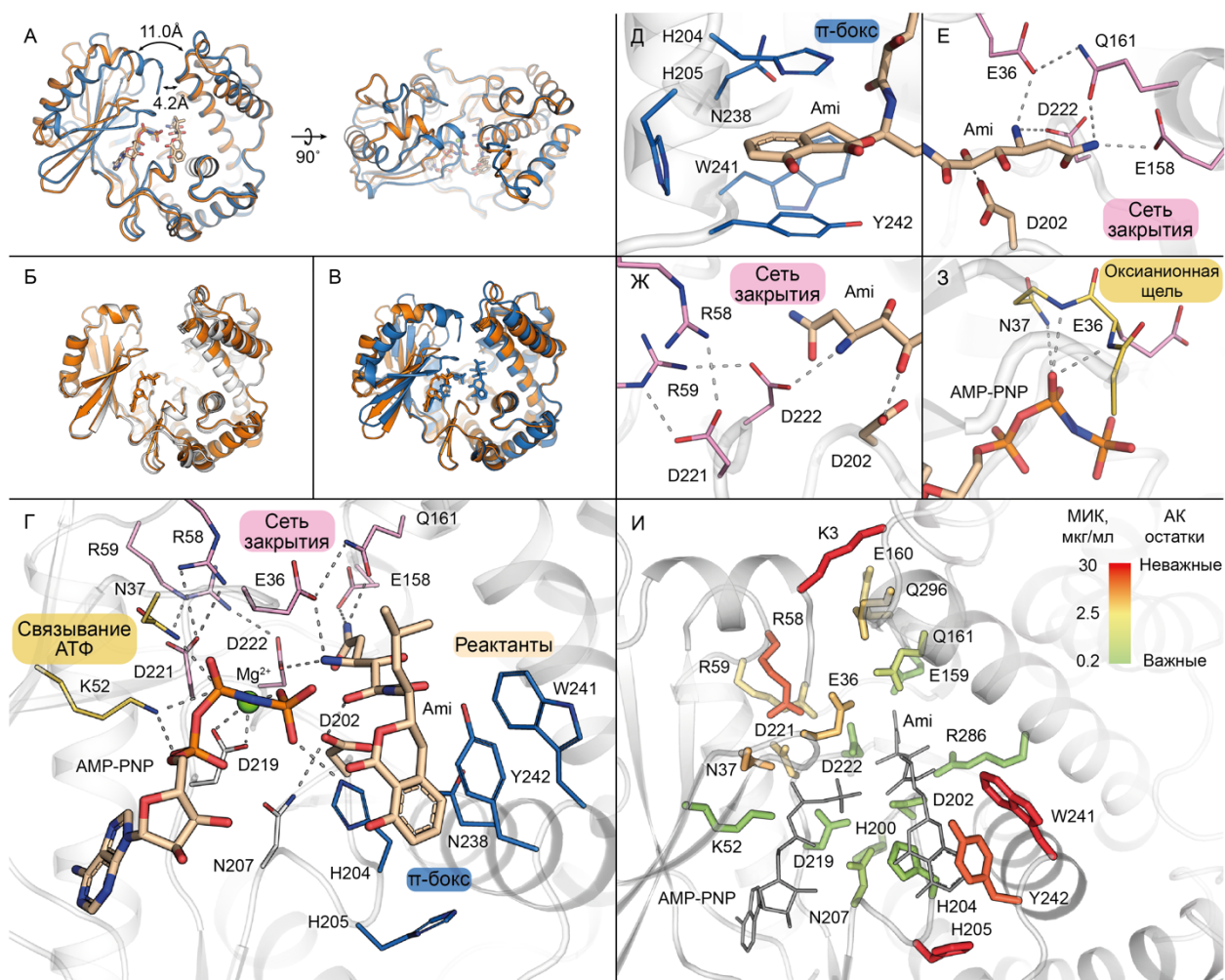


Рисунок 13. А. Общий вид открытого и закрытого состояний AmiN, опосредованное связыванием Ami. Представлены структуры AmiN без лигандов (оранжевый) и AmiN (синий) в комплексе с ионом Mg^{2+} , AMP-PNP и Ami. Б. Наложение кристаллической структуры AmiN без лигандов (серый) и AmiN в комплексе с АТФ (оранжевый). В. Наложение кристаллической структуры AmiN в комплексе с АТФ (оранжевый) и AmiN в комплексе с Mg^{2+} , AMP-PNP и Ami (синий). Г. Общий вид активного центра AmiN. Д. π -бокс, отвечающий за связывание с высоким сродством Ami. Е, Ж. Внутримолекулярная сеть взаимодействий между Е. $NH_3^+_{Ami}$ -E36-Q161- $CONH_2_{Ami}$ и Ж. Ami-D222-D221-R58-R59, благодаря чему обеспечивается стабилизация закрытого состояния AmiN. З. Образование оксианионной щели происходит в результате образования закрытой формы AmiN. И. Аминокислотные остатки, необходимые для обеспечения каталитической активности AmiN. Цвет указывает на устойчивость к амикумину штаммов *E. coli*

BW25113 *ΔtolC*, продуцирующих Ala-замещенные мутанты AmiN, определенную как минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) рекомбинантных штаммов

Закрытая форма AmiN стабилизируется сетью внутримолекулярных взаимодействий между аминокислотными остатками N-концевого АТФ-связывающего домена, субстрат-связывающего домена и гидрофильными функциональными группами амикумацина (рис. 13, Г, Е и Ж). Образование закрытой формы AmiN приводит к позиционированию Ami и сближению γ -фосфатной группы АТФ с гидроксильной группой амикумацина, в результате чего образуется оксианионная щель, играющая активную роль в процессе переноса метафосфат-аниона (рис. 13, З).

Для валидации предполагаемых функций аминокислотных остатков, необходимых для обеспечения катализа, был проведен аланиновый скрининг активного центра AmiN. К полной потере активности приводили замены остатков: D202, отвечающего за активацию нуклеофила, D219 и D222, отвечающих за связывание иона металла, N207 и H204, стабилизирующих метафосфат-анион, K52 – позиционирует АТФ, R286, которая правильно позиционирует активированный нуклеофил, а также остатки E159 и Q161, отвечающие за стабилизацию закрытого состояния (рис. 13, И).

Исследование механизмов каталитической активности киназ амикумацина

Мы исследовали зависимость скорости реакции фосфорилирования Ami от концентрации Mg^{2+} (рис. 14, А). Было показано, что скорость реакции фосфорилирования растет с увеличением концентрации Mg^{2+} вплоть до стехиометрического соотношения между Mg^{2+} и АТФ. Дальнейшее увеличение концентрации ионов Mg^{2+} приводит к ингибированию реакции (рис. 14, А).

Более детальное исследование зависимости скорости реакции фосфорилирования Ami от концентрации Mg^{2+} и АТФ позволило нам утверждать, что наблюдаемая скорость реакции фосфорилирования Ami коррелирует с концентрацией комплекса $[АТФ \cdot Mg^{2+}]$, достигая максимума в условиях, когда все молекулы АТФ находятся в комплексе $[АТФ \cdot Mg^{2+}]$ (рис. 14, Б).

Таким образом, на основании кинетических и структурных данных мы пришли к выводу, что AmiN необходим один ион Mg^{2+} для обеспечения максимальной ферментативной активности, в отличие от протеинкиназ, которым требуется два иона Mg^{2+} для катализа.

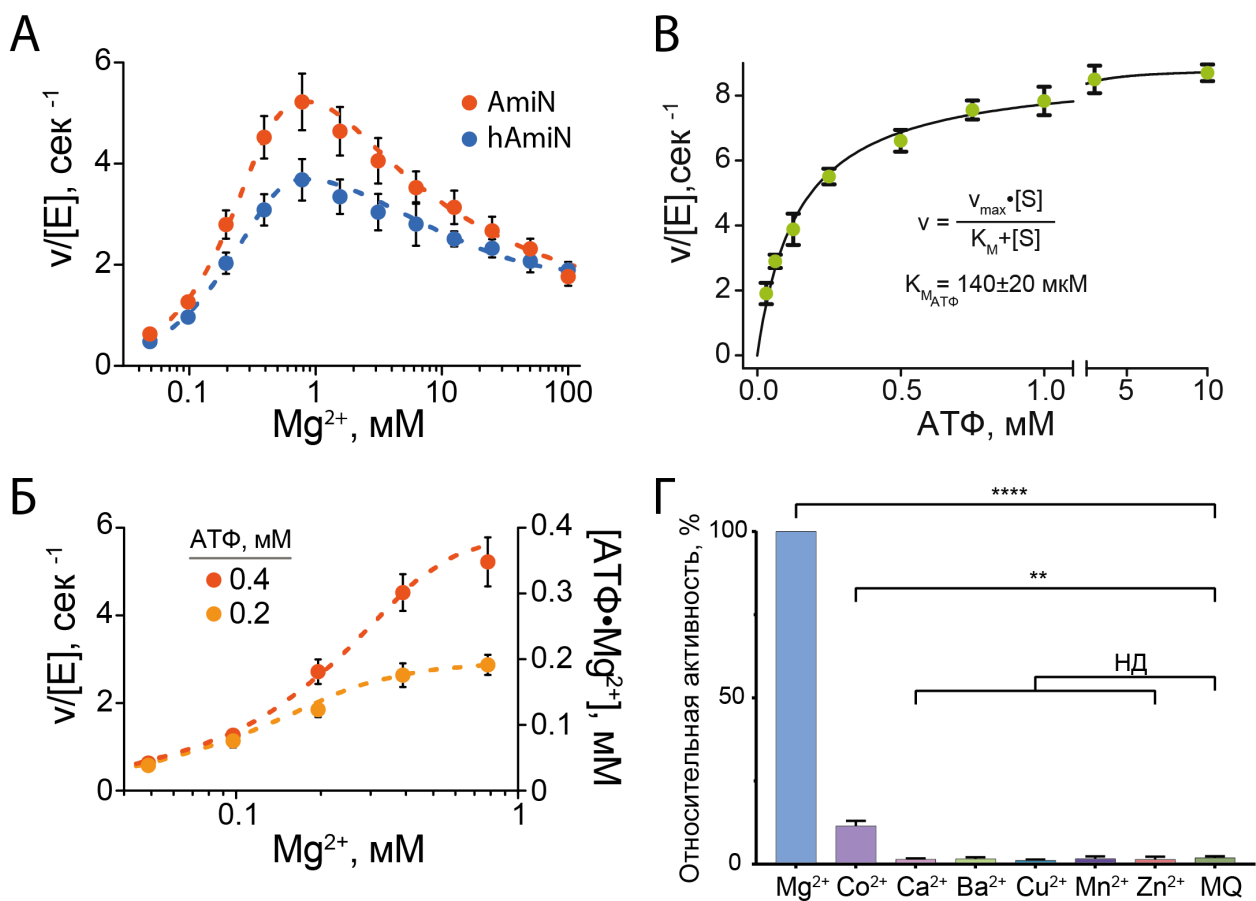


Рисунок 14. Данные исследования металл-зависимости AmiN-подобных киназ. **А.** Зависимость скорости реакции $v/[E]$ от концентрации Mg^{2+} показывает, что при увеличении концентрации ионов металлов выше физиологического уровня ~ 1 мМ приводит к ингибированию реакции. Измерение скорости реакции определяли с использованием 0.4 мМ АТФ в трех независимых повторностях. Данные представляют среднее значение \pm SD. **Б.** Скорость реакции $v/[E]$ фосфорилирования Ami зависит от концентрации комплекса $[ATP \cdot Mg^{2+}]$, рассчитанная с использованием константы диссоциации данного комплекса $K_d = 28.6$ мкМ. **В.** Зависимость скорости реакции $v/[E]$ фосфорилирования Ami от концентрации АТФ показывает, что избыток АТФ, который способен связывать свободные ионы Mg^{2+} , не приводит к ингибированию реакции. **Г.** Активность AmiN с различными ионами Me^{2+} в качестве кофакторов. Относительная активность была определена как отношение скоростей реакции в сравнении со скоростью в присутствии Mg^{2+}

Кроме того, избыток концентрации АТФ, способного связывать в комплекс ионы Mg^{2+} , не приводил к ингибированию реакции (рис. 14, В). Совокупность полученных данных позволяет нам с уверенностью заявлять, что киназам AmiN и hAmiN для обеспечения катализа необходим только один ион Mg^{2+} .

Анализ активности киназы AmiN в присутствии различных двухвалентных ионов металлов показал нам, что максимальную ферментативную активность фермент проявляет в реакции с ионом Mg^{2+} в качестве кофактора, при этом сниженная на 88% активность AmiN наблюдалась в присутствии иона Co^{2+} в реакционной смеси (рис. 14, Г).

Молекулярное моделирование подтвердило данные рентгеноструктурного анализа, свидетельствующие об образовании закрытой формы фермента только после связывания AmiN с амикумацином вместе с АТФ (рис. 13, А, Б и В, и состояние $E \cdot S$ рис. 15, А), после чего формируется ранее упомянутая сеть закрытия (рис. 13, Е и Ж). Фосфорилирование Ami приводит к изменению конформации AmiN, стимулируя образование открытой формы фермента и выход продукта реакции (состояние $E^* \cdot P$, рис. 15, А).

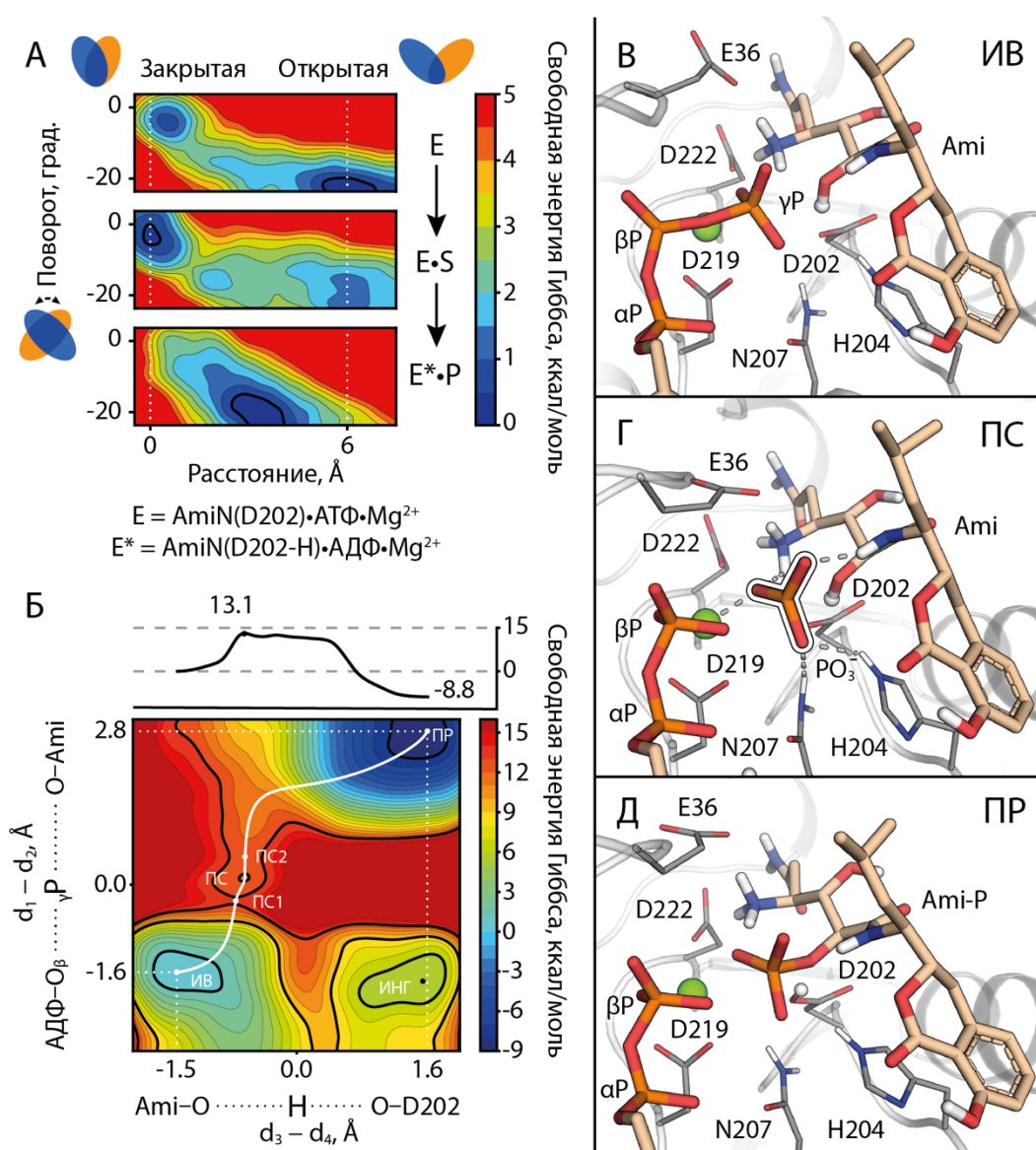


Рисунок 15. А. График свободной энергии Гиббса указывают на то, что образование закрытой формы AmiN индицируется связыванием с Ami ($E \cdot S$), а открытие индуцируется

продуктами реакции ($E^* \cdot P$). **Б.** Диаграмма координаты реакции и ландшафт свободной энергии Гиббса. Точками показаны стационарные точки на пути реакции. ИВ – исходные вещества; ПС1 и ПС2 – переходные состояния; ПС – промежуточное состояние; ПР – продукты реакции; ИНГ – состояние ингибирования. **В – Д.** Стадии реакции переноса метафосфат-аниона по диссоциативному механизму.

Молекулярное моделирование с использованием метадинамики указывают на то, что реакция фосфорилирования амикумамина киназой $AmiN$ протекает по диссоциативному механизму (рис. 15, от Б до Д), а образование закрытой конформации фермента необходимо для осуществления переноса метафосфат-аниона.

Молекулярное моделирование, проведенное на основе структурных и биохимических данных $AmiN$, позволило нам получить представление о стадиях реакции фосфорилирования. На первом этапе реакции происходит образование закрытой формы фермента и правильное позиционирование субстрата (рис. 15, В). На втором этапе от молекулы АТФ диссоциируется гамма-фосфатная группа. Метафосфат-анион стабилизируется водородными связями с аминокислотными остатками H204 и N207, а также амидной группой Ami . При этом за координацию метафосфат-аниона отвечает ион Mg^{2+} (рис. 15, Г). На третьей стадии реакции гидроксильная группа амикумамина активируется за счет переноса протона на остаток D202, и одновременно с этим процессом происходит образование связи P–O (рис. 15, Д).

Выводы.

1. С использованием ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы осуществлен скрининг микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris*. Были идентифицированы индивидуальные бактериальные штаммы, проявляющие антимикробные свойства по отношению к патогенной бактерии *S. aureus*. Изолирован штамм *Bacillus pumilus* 124, продуцирующий антибиотик амикумадин (Ami).
2. Разработана технология глубокого функционального профилирования бактериальных сообществ, позволяющая осуществлять персонифицированный скрининг антибиотикорезистентности. Разработанная платформа позволила детализировать спектр активности Ami.
3. С помощью полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа генома идентифицирован кластер генов биосинтеза Ami, включающий два ранее не известных фермента AmiN и AmiO. Показано, что киназа AmiN инактивирует Ami в результате его фосфорилирования, в то время как фосфатаза AmiO участвует в последующей реактивации Ami дефосфорилируя фосфопроизводное Ami.
4. Открыто новое подсемейство AmiN-подобных киназ суперсемейства аминокликозид фосфотрансфераз (АРН), обеспечивающих резистентность к Ami. Проведено биохимическое, кинетическое и структурное исследование киназы AmiN, а также молекулярное моделирование процесса фосфорилирования Ami.
5. Показано, что для обеспечения протекания реакции фосфорилирования необходимо образование закрытой формы фермента. Установлено, что реакция фосфорилирования Ami киназой AmiN протекает по диссоциативному механизму, а для обеспечения каталитической активности AmiN необходим один ион Mg^{2+} .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Terekhov S, Smirnov I, Malakhova M, Samoilo A, Manolov A, Nazarov A, Danilov D, Dubiley S, Osterman I, Rubtsova M, Kostryukova E, Ziganshin R, Kornienko M, Vanyushkina A, Bukato O, Ilina E, Vlasov V, Severinov K, Gabibov A, Altman S. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. PNAS, 115, 38, p. 9551-9556, 2018 Sep 18.
2. Stanislav S. Terekhov*, Yuliana A. Mokrushina*, Anton S. Nazarov*, Alexander Zlobin*, Arthur Zalevsky, Gleb Bourenkov, Andrey Golovin, Alexey Belogurov Jr., Ilya A. Osterman, Alexandra A. Kulikova, Vladimir A. Mitkevich, Hua Jane Lou, Benjamin E. Turk, Matthias Wilmanns, Ivan V. Smirnov, Sidney Altman and Alexander G. Gabibov. A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding. Science Advances, 6, 26, eaaz9861, 2020 Jun 24. (* - равный вклад авторов).
3. S. Terekhov, A. Nazarov, Y. Mokrushina, M. Baranova, N. Potapova, M. Malakhova, E. Ilina, I. Smirnov, A. Gabibov. Deep functional profiling facilitates the evaluation of the antibacterial potential of antibiotic amicoumacin. Antibiotics, 9, 157, 2020 April 2.

Опубликованные тезисы и доклады конференций:

1. Nazarov, S. Terekhov, D. Danilov, I. Smirnov, A. Gabibov. Biocatalytic properties of hypothetic proteins from amicoumacin biosynthetic gene cluster involved in antibiotic activation and self-resistance. Poster 43rd FEBS 2018, Prague, Czech Republic
2. Stanislav S. Terekhov, Ivan V. Smirnov, Anton S. Nazarov, Alexander G. Gabibov. Ultrahigh-throughput screening techniques for investigation of bacterial interactions in microbiota community. Poster 43rd FEBS 2018, Prague, Czech Republic
3. Stanislav S. Terekhov, Ivan V. Smirnov, Anton S. Nazarov, Alexander G. Gabibov. Deep functional profiling of microbiomes. Poster 43rd FEBS 2018, Prague, Czech Republic
4. А.С. Назаров, С.С. Терехов, А.Г. Габибов. Структурные перестройки активного центра AmiN-подобных киназ определяют уникальную эффективность инактивации изокумариновых антибиотиков. Доклад. XXXIII зимняя молодежная научная школа, 2020, Москва, Россия.
5. A.S. Nazarov, S.S. Terekhov, I.V. Smirnov, A.G. Gabibov. A novel kinase provides self-resistance to isocoumarin antibiotic amicoumacin A in *Bacillus*. Poster. 45th FEBS 2021, Slovenia, Ljubljana.

Патенты:

1. С.С. Терехов, А.С. Назаров, Ю.А. Мокрушина, И.В. Смирнов, А.Г. Габибов. Способ получения антибиотика амикумацин А. Патент на изобретение RU 2739825 С1, 28.12.2020. Заявка №2019144625 от 27.12.2019.