

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Назаров Антон Сергеевич

Поиск новых биологически активных соединений с помощью
подходов ультравысокопроизводительного скрининга

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

1.5.6. - Биотехнология

Научный руководитель

Кандидат химических наук

Терехов Станислав Сергеевич

Москва 2021

Оглавление

Список использованных сокращений	6
Введение	8
1. Обзор литературы	10
1.1. Классические методы поиска биологически активных соединений	10
1.2. «Золотая эра» открытия антибиотиков – платформа Ваксмана	12
1.3. Полусинтетические антибактериальные препараты	15
1.4. Полностью синтетические антибиотики	19
1.5. Появление геномики: целевой скрининг	21
1.6. Ультравысокопроизводительный микрофлюидный скрининг..	27
2. Материалы и методы	38
2.1. Химические реактивы и сопутствующие материалы.....	38
2.1.1. Реактивы:	38
2.1.2. Ферменты:.....	39
2.1.3. Маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы:	39
2.1.4. Поверхностно-активные вещества и модификаторы:	39
2.1.5. Плазмидные вектора:.....	39
2.1.6. Бактериальные штаммы:	39
2.1.7. Клеточные линии:	40
2.1.8. Растворы	40
2.1.9. Бактериальные среды	40
2.1.10. Антибиотики	40
2.2. Методы работы с нуклеиновыми кислотами	41
2.2.1. Амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР	41

2.2.2. Рестрикция.....	42
2.2.3. Лигирование	42
2.2.4. Выделение плазмидной ДНК.....	42
2.2.5. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	42
2.2.6. Секвенирование плазмидной ДНК.....	43
2.2.7. Создание генетических конструкций, кодирующих киназы AmiN и hAmiN и фосфатазу AmiO	43
2.3. Методы работы с бактериями <i>E. coli</i>	43
2.3.1. Получение электрокомпетентных клеток.....	43
2.3.2. Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом электропорации ...	44
2.3.3. ПЦР с колоний	45
2.3.4. Ночная культура.....	45
2.3.5. Приготовление музейного штамма	45
2.4. Методы работы с бактериями рода <i>Bacillus</i>	45
2.4.1. Продукция и очистка антибиотика амикумацина.....	45
2.5. Методы работы с клетками линии НЕК293Т.....	46
2.5.1. Культивирование клеток линии НЕК293Т.....	46
2.6. Методы работы с белками.....	47
2.6.1. Электрофорез в полиакриламидном геле	47
2.6.2. Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди	48
2.6.3. Продукция и очистка киназ AmiN и hAmiN	48
2.6.4. Получение кристаллов киназ AmiN и hAmiN.....	49
2.6.5. Измерение кинетических параметров ферментов AmiN и hAmiN	50
2.6.6. Измерение термодинамических параметров связывания ферментов AmiN и hAmiN с субстратами.....	51
2.6.7. Измерение активности киназ AmiN и hAmiN по отношению к различным субстратам	52

2.6.8. Измерение киназной активности AmiN по отношению к пептидам	52
2.7. Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга антимикробной активности	53
2.7.1. Отбор представителей микробиоты, ингибирующих рост <i>S. aureus</i>	53
2.7.2. Регенерация и идентификация культивируемых бактерий-ингибиторов <i>S. aureus</i>	54
2.7.3. Отбор бактерий-ингибиторов <i>S. aureus</i> с использованием классических микробиологических подходов скрининга на чашках (платформы Ваксмана)	55
2.7.4. Измерение ингибирующих свойств метаболитов в жидкой культуре	55
2.7.5. 16S рРНК секвенирование бактерий	56
2.7.6. Полногеномное секвенирование бактерий	56
2.8. Методы структурного анализа	57
2.8.1. Разрешение структуры на основе данных рентгеноструктурного анализа	57
3. Результаты и обсуждение	59
3.1. Скрининг микробиоты с целью идентификации штаммов, проявляющих антимикробную активность	59
3.2. Исследование антимикробной активности штамма <i>B. pumilus</i> 124	60
3.3. Анализ кластера генов биосинтеза амикумацина	67
3.4. Ферментативные свойства киназы AmiN	75
3.5. Анализ гомологов киназы AmiN	83

3.6. Исследование структурно-функциональных особенностей киназы AmiN	87
3.7. Исследование механизмов каталитической активности киназ амикумацина.....	91
Выводы.....	100
Список литературы	101
Приложение	113

Список использованных сокращений

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖХ/МС – жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

ИПТГ - изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ - полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТФЭ – твердофазная экстракция

AMP-PNP – аденил-имидодифосфат

BSA – бычий сывороточный альбумин

FACS – флуоресцентно-активированный клеточный сортинг

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США)

GFP – зеленый флуоресцентный белок

ИТС – изотермическая титрационная колориметрия

MBP – основной белок миелина

MDE – микрофлюидная двойная эмульсия

mRFP1 – красный флуоресцентный белок 1

NGS – высокопроизводительное секвенирование нового поколения

PACS – ПЦР-активированный клеточный сортинг

SD – среднее квадратичное отклонение

uHTS – ультравысокопроизводительный скрининг

WGA – полногеномная амплификация

Введение

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. Поэтому данная группа веществ является источником для поиска новых эффективных антибактериальных агентов.

Большая часть используемых в современной клинической практике антибактериальных препаратов была получена с использованием классических микробиологических подходов, основанных на культивации отдельных штаммов и анализе их противомикробной активности. Тем не менее, такой метод на сегодняшний день стал неэффективным, так как его применение часто приводит к переоткрытию одних и тех же легко культивируемых бактерий, и, соответственно, переоткрытию тех же самых антибиотиков. Поэтому с конца 1980-х годов наблюдается так называемый «пробел в открытии» новых антибиотиков [1].

Альтернативные методы, появившиеся недавно, основаны на высокопроизводительном секвенировании и биоинформатическом анализе. Они позволяют с высокой производительностью находить новые кластеры генов биосинтеза антибиотиков *in silico*. Для дальнейшей идентификации вторичных метаболитов бактерий необходимо проводить клонирование и гетерологическую экспрессию кластеров генов, что 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 анализировать отдельные объекты целых

микробиомов и изолировать интересующие бактерии, на основании их функциональной активности. Тем самым микрофлюидный высокопроизводительный скрининг обеспечивает 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.

Данная диссертационная работа посвящена применению новой высокоэффективной микрофлюидной платформы для анализа образца экзотической микробиоты. В задачи исследования входят идентификация бактерий, обладающих антимикробной активностью, а также детальный анализ метаболизма и механизмов биосинтеза найденных антимикробных соединений.

1. Обзор литературы

1.1. Классические методы поиска биологически активных соединений

Вопреки распространенному мнению, использование антибиотиков человечеством не ограничивается лишь современной «антибиотической эрой». К примеру следы тетрациклина были обнаружены в человеческих скелетных остатках, найденных на территории древней Нубии, которые были датированы 350-550 годом н.э. [2]. Распределение тетрациклина в костях можно объяснить только присутствием в рационе этих древних людей продуктов, содержащих тетрациклин. Другим примером антибактериального воздействия на древних людей является результат гистологического исследования проб из бедренных диафизов скелетов позднего римского периода, найденных в Дахлехском оазисе, Египет [3]. Эти образцы показали дискретные флюорохромовые маркеры, подтверждающие присутствие в то время тетрациклина в рационе людей. Предполагаемое потребление тетрациклина в этих популяциях возможно имело защитный эффект, поскольку зарегистрированный уровень инфекционных заболеваний в суданском нубийском населении был низок, и также не были обнаружены следы инфекции в образцах костей из Дахлехского оазиса.

Начало же современной «антибиотической эры» ассоциировано с такими выдающимися учеными как Пауль Эрлих и Александр Флеминг. Эрлих высказал идею о так называемой «волшебной пуле», которая бы избирательно уничтожала бактериальный организм, не затрагивая здоровые ткани хозяина. Основанием для этого послужило наблюдение того факта, что анилин и другие синтетические красители могли окрашивать лишь определенные микробы, оставляя при этом неокрашенными другие группы микроорганизмов. Эрлих утверждал, что химические соединения могут быть синтезированы так, чтобы они «могли воздействовать исключительно на паразитов, укрытых внутри организма» [4]. Открытие Эрлихом вещества,

названного Сальварсаном, в 1909 году для лечения сифилиса называется первой магической пулей.

Систематический подход к скринингу, предложенный Паулем Эрлихом, стал краеугольным камнем стратегий поиска лекарственных средств в фармацевтической промышленности и привел к тому, что на сегодняшний день тысячи лекарств были идентифицированы и введены в клиническую практику, включая, разумеется, различные противомикробные препараты.

Другое важное событие, которое дало начало широкомасштабным исследованиям в области поиска и разработки антибиотических препаратов, произошло 3 сентября 1928 года, когда Александр Флеминг открыл пенициллин [5]. Хотя антибактериальные свойства плесени были известны с древних времен, и исследователи, работавшие до него, время от времени сталкивались с аналогичными наблюдениями относительно антимикробной активности *Penicillium*. В течение 12 лет после первоначальной идентификации пенициллина А. Флеминг пытался найти химиков, заинтересованных в решении проблем с очисткой и стабильностью активного вещества, и отправил штамм *Penicillium* всем исследователям, кто его просил. В конце концов он отказался от этой идеи в 1940 году, но, к счастью, в том же году команда Оксфорда во главе с Говардом Флори и Эрнестом Чейном опубликовала статью, в которой описывалась очистка пенициллина в количестве, достаточном для клинического тестирования [6]. Их протокол в конечном итоге привел к массовому производству и распространению пенициллина в 1945 году. Метод скрининга Флеминга с использованием зон ингибирования на газоне патогенных бактерий на поверхности пластин с агарозной средой требовал гораздо меньше ресурсов, чем любое другое исследование на моделях болезней животных и, таким образом, стал широко использоваться для скрининга антибиотик производящих микроорганизмов многими исследователями в академических кругах и промышленности.

Так началась эра поиска и открытий новых антибиотических препаратов, которая продолжается и по сей день.

1.2. «Золотая эра» открытия антибиотиков – платформа Ваксмана

Выдающиеся успехи в области поиска антимикробных препаратов в начале 20 века вдохновили американского микробиолога Сельмана Ваксмана на дальнейшие исследования в сфере открытия новых лекарственных антимикробных средств. В 1937 году он заметил, что почвенные бактерии - актиномицеты - подавляют рост других бактерий. На основании своих наблюдений Ваксман понял, что этот биологический механизм конкуренции между бактериями [7] может стать принципиальной основой для платформы скрининга микроорганизмов, продуцирующих антибиотики [8]. В результате появился метод скрининга бактериальных штаммов на наличие антибактериальной активности, основанный на высевании бактерий на агар и последующем анализе зон ингибирования.

По сегодняшним оценкам, начиная с 1939 года, такой систематический скрининг бактерий позволил исследовать более 10 000 различных штаммов микроорганизмов на наличие антимикробной активности [9], что свидетельствует о достаточной на тот момент производительности платформы. Платформа Ваксмана позволила достаточно быстро идентифицировать новые противомикробные вещества: актиномицин, стрептотрицин, фумигацин и клавацин; однако только в 1944 году был обнаружен штамм *Streptomyces griseus*, который продуцировал нетоксичный аминогликозидный ингибитор прокариотической трансляции, названный стрептомицином.

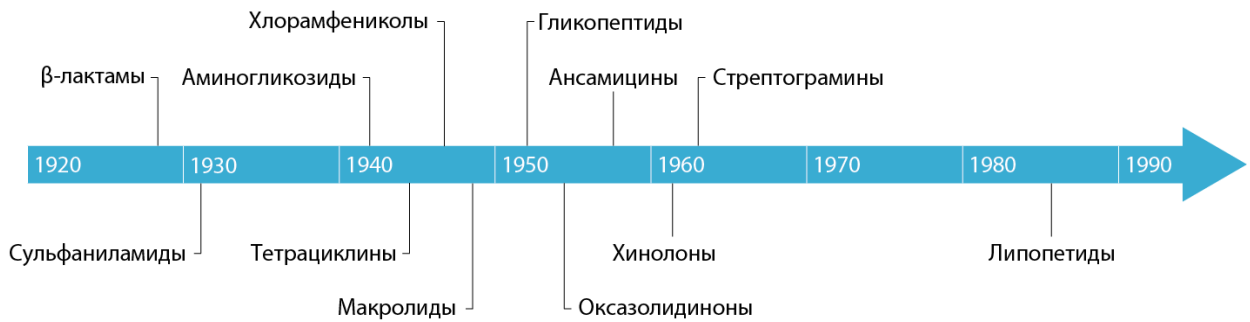


Рисунок 1. График открытия классов антибиотиков. Адаптировано из [8].

Платформа Ваксмана позволила идентифицировать основные классы антибиотиков (рис. 1), которые и по настоящее время используются в клинической практике. Так удалось идентифицировать хлорамфеникол, который был первоначально выделен в 1947 году из актиномицета *Streptomyces venezuelae*, тем самым открывая новый класс антибиотиков - амфениколов. Антимикробная активность хлорамфеникола обусловлена его способностью связываться с 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы, подавляя синтез бактериального белка. Это был первый одобренный FDA антибиотик широкого спектра действия, демонстрирующий отличную способность проникать в живые ткани.

Идентификация хлортетрациклина, вторичного метаболита бактерии *Streptomyces aureofaciens*, ознаменовала открытие ещё одного класса антибиотиков – тетрациклинов, в 1948 году. Антибиотики этого класса ингибируют синтез белка путём взаимодействия с 30S субъединицей бактериальной рибосомы. Хлортетрациклин проявляет нестабильность в кислых и щелочных условиях, что значительно снижает его биодоступность [10].

В 1949 году был открыт эритромицин, продуцируемый *Saccharopolyspora erythraea*, тем самым выделяя ещё один класс терапевтических антибиотиков – макролидов.

В отличие от описанных выше классов антибиотиков, которые ингибируют синтез бактериального белка, гликопептиды нарушают процесс

синтеза клеточной стенки. Первый антибиотик из класса гликопептидов, ванкомицин, был выделен в 1956 году из бактерии *Amycolatopsis orientalis* и в настоящее время является антибиотиком «последней надежды». Ванкомицин ингибирует биосинтез клеточной стенки, связываясь с терминальными остатками D-Ala-D-Ala тетрапептида N-ацетилмурамовой кислоты, в результате чего останавливается реакция транспептидации между мономерами пептидогликана [11].

Аналогичным образом антибиотики группы ансамицинов отличаются от ингибиторов синтеза белка (например, амфениколов, тетрациклинов, макролидов) и ингибиторов синтеза клеточной стенки (например, гликопептидов). Например, антибиотики подкласса рифамицинов ингибируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу прокариот. Рифамицин В был впервые выделен в 1959 г. из бактерии *Streptomyces mediterranei* (позже классифицированного как *Amycolatopsis mediterranei*). Несмотря на то, что рифамицин В имел слабый антимикробный эффект, он показал новую потенциальную метаболическую мишень для антимикробной терапии [12].

В 1969 году был открыт фосфомицин, антимикробное действие которого обусловлено ингибированием N-ацетил-D-глюкозамино-3-енолпирувил-трансферазы. В результате чего ингибируются начальные этапы биосинтеза клеточной стенки. Фосфомицин обладает широким спектром действия, что сделало его привлекательным противомикробным средством [13].

Первый антибиотик класса липопептидов был открыт в 1947 году. Им стал полимиксин Е, выделенный из бактерии *Paenibacillus polymyxa*. Терапевтическое использование этого класса антибиотиков долгое время было ограничено лишь экспериментальным применением из-за многочисленных побочных эффектов. Другой антибиотик класса липопептидов даптомицин был выделен из бактерии *Streptomyces roseosporus* в 1980 году. На начальных этапах исследования даптомицин пытались ввести

в клиническую практику, однако испытания были прекращены из-за относительно низкой эффективности по сравнению с возможными рисками приёма данного антибиотика. Тем не менее в 2003 году компания Cubist Pharmaceuticals возобновила испытания даптомицина и после корректировки дозировки антибиотик вышел на рынок [14]. Механизм антибактериальной активности даптомицина до сих пор остаётся невыясненным. Наиболее вероятным механизмом действия являются пермеабилитация и деполяризация клеточной мембраны, блокирование синтеза клеточной стенки или нарушение клеточного роста. Хотя описано много циклических липопептидов, даптомицин на данный момент остаётся единственным одобренным терапевтическим антибиотиком этого класса [15].

1.3. Полусинтетические антибактериальные препараты

Платформа Ваксмана позволила исследователям идентифицировать антибактериальные соединения, принадлежащие различным классам. При этом не все открытые антибиотики обладали достаточной активностью для использования в клинической практике, либо имели негативные побочные эффекты. Решение данной проблемы выглядело простым, необходимо было химически модифицировать найденные антибактериальные агенты с целью улучшить антимикробные или фармакокинетические свойства, или нивелировать побочные эффекты. Так появилось направление частичного химического синтеза, или полусинтеза.

Антибактериальный полусинтез представляет собой тип химического синтеза, в котором в качестве прекурсоров используются вторичные метаболиты бактерий и грибов для производства других новых соединений с улучшенными химическими и терапевтическими свойствами.

Эволюционно сложилось так, что природные антибактериальные соединения эффективно связывают свою молекулярную мишень, но при этом не гарантируется терапевтическая эффективность, химическая стабильность

или биобезопасность. Химическая модификация таких соединений направлена на решение этих проблем. Не менее важен тот факт, что химическая модификация вторичных метаболитов позволяет обойти патенты, делая программы по разработке антибиотиков более окупаемыми, и таким образом более привлекательными для фармацевтических компаний.

Эра химического полусинтеза началась в 1946 году с получения гидрированного стрептомицина, который характеризовался большей химической стабильностью наряду с аналогичной антимикробной активностью. Хотя и стрептомицин, и его новое производное быстро вошли в клиническую практику, в конечном итоге их использование было ограничено из-за опасений по поводу ототоксичности [16].

Ключевой характеристикой химического полусинтеза является скорость, с которой могут быть синтезированы производные с улучшенными свойствами, давая преимущество в борьбе с инфекционными заболеваниями. Тем не менее, бактериальная резистентность к этим полусинтетическим противомикробным препаратам растет с такой же скоростью, что и для не модифицированных препаратов, что, как полагают, связано с частотой использования антибиотика и подчеркивает важность непрерывной разработки новых полусинтетических производных [17].

Полусинтетические пенициллины получают путем производства 6-аминопеницилиновой кислоты из пенициллина G, которая затем очищается и химически модифицируется [18]. Параллельно с получением полусинтетических пенициллинов шел процесс химической модификацией другой подгруппы β -лактамов – цефалоспоринов.

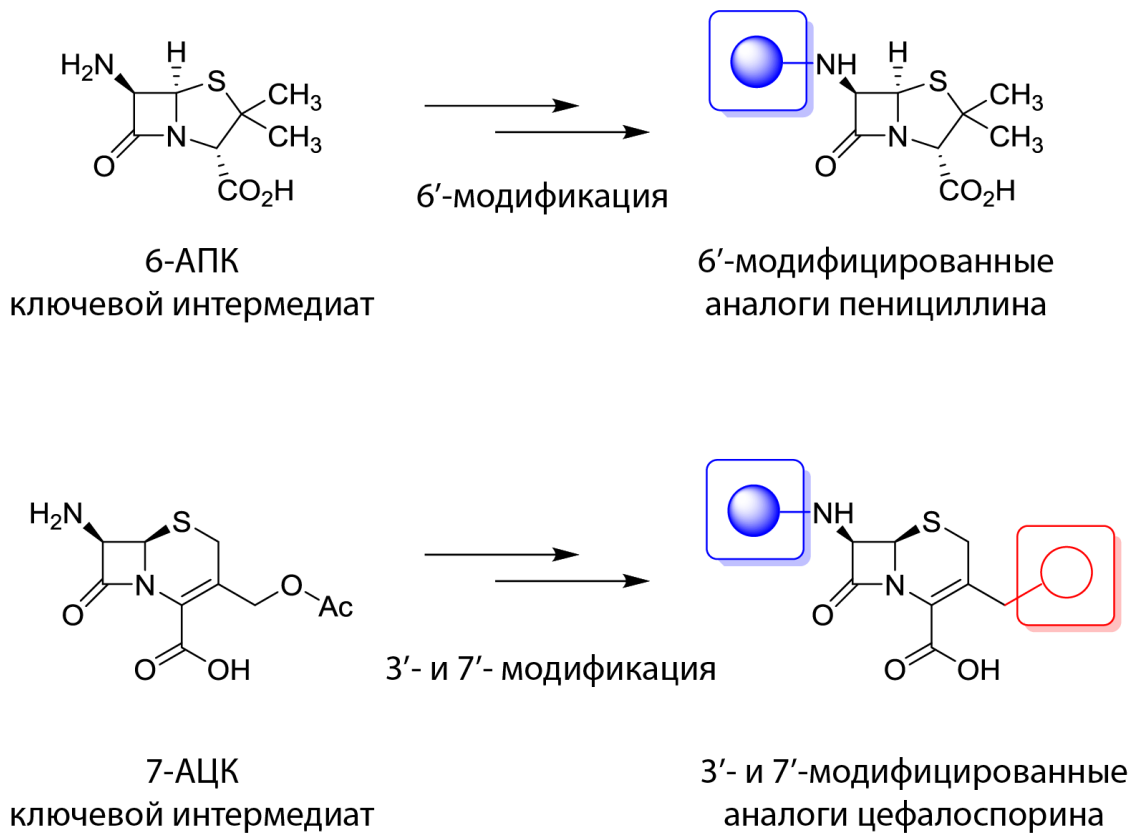


Рисунок 2. Общая структура полусинтетических аналогов пенициллина и цефалоспоринов и сайты модификации ключевых интермедиатов 6-аминопеницилиновой кислоты (6-АПК) и 7-аминоцефалоспорановой кислоты (7-АЦК). Адаптировано из [19].

Антибиотики подгруппы цефалоспоринов имели ряд преимуществ над пенициллинами, таких как сниженная частота возникновения бактериальной резистентности, а также побочных эффектов. Помимо этого, цефалоспорины имели в своей структуре дополнительный сайт для химической модификации (рис. 2) [19]. Цефалоспорин С был впервые идентифицирован как метаболит бактерии *Cephalosporium acremonium* в 1948 году. К 1959 году была получена 7-аминоцефалоспорановая кислота путем гидролиза цефалоспорина С в кислых условиях [20]. Рисунок 3 иллюстрирует эволюцию полусинтетических цефалоспоринов, график их внедрения, а также плюсы и минусы последующих поколений, представленных на рынке до сих пор.

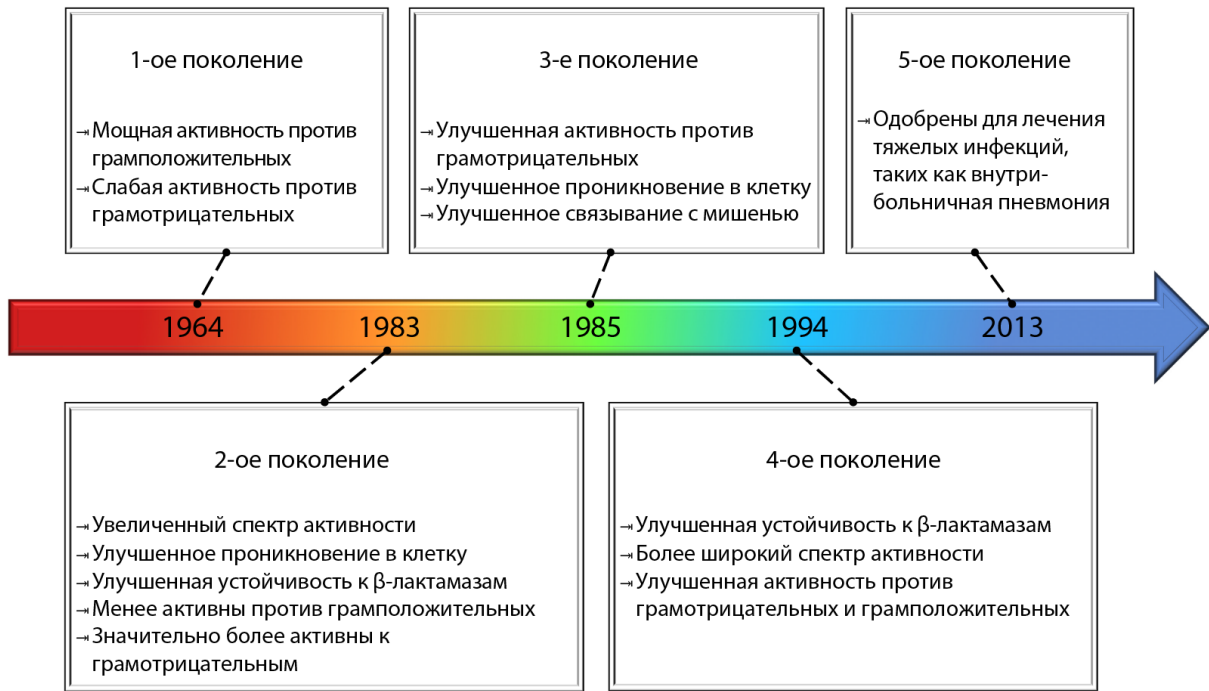


Рисунок 3. Эволюция полусинтетических цефалоспоринов в течение поколений. Поскольку каждое последующее поколение антибиотиков является результатом добавления различных функциональных групп к 7-аминоцефалоспороановой кислоте, то характеристики каждого нового поколения не обязательно наследуются последующими поколениями. Например, цефалоспорины второго поколения обладают сниженной эффективностью в отношении грамположительных патогенов, несмотря на их улучшенные свойства. Адаптировано из [21].

В 1953 году была проведена реакция гидрогенолиза хлортетрациклина и получение полусинтетического тетрациклина, хотя позже тетрациклин был идентифицирован как естественный вторичный метаболит [22]. В то время как полусинтетические цефалоспорины в основном являются производными 7-аминоцефалоспороановой кислоты, полученными путем добавления различных химических групп в положения C7 и C3', полусинтетические тетрациклины и макролиды получают за счет модификации коровой структуры антибиотика.

Модификация каркаса молекулы является значительно более сложной задачей, чем присоединение различных химических групп. За последние 60

лет на рынке вышло менее 10 полусинтетических тетрациклинов по сравнению с более чем 50 коммерчески выпускаемыми производными β -лактама. Однако недавние достижения в области синтетических методов возродили потенциал синтеза производных тетрациклина [10,23], что имеет важное значение в борьбе с антибиотикорезистентностью, учитывая, что полусинтез является одной из основных стратегий открытия новых антибиотиков.

1.4. Полностью синтетические антибиотики

Тотальный синтез антибиотиков позволяет не только создавать новые молекулы *de novo*, но и производить их в больших масштабах, что обеспечивает более простое использование в клинической практике. Хлорамфеникол стал первым полностью синтетическим антибиотиком, изначально выделенным из *Streptomyces venezuelae* в 1947 году, и поступил в клиническую практику в 1949 году. Замена нитрогруппы в структуре хлорамфеникола на метансульфонил позволило создать в 1952 году тиамфеникол, который обладал более выраженным противомикробным действием и вызывал меньше негативных побочных эффектов [24]. Открытый в 1953 году вторичный метаболит бактерии *Nocardia mesenterica* азомицин не нашел клинического применения до тех пор, пока не было получено оптимизированное полностью синтетическое производное метронидазол. Аналогично метронидазолу, фосфомицин нашел клиническое применение только после того, как компания Merck разработала протокол рацемического синтеза [13]. Хотя преимущества полностью химического синтеза вторичных метаболитов очевидны, полностью синтетические антибиотики также привели к созданию новых структурных классов антибиотиков. Поскольку известно, что синтетические аналоги пириимидиновых и пуриновых оснований могут ингибировать рост бактерий, в 1962 году было синтезировано производное диаминопириимидина - триметоприм [25].

Класс антибиотиков хинолонов был обнаружен как побочный продукт синтеза противомаларийного препарата хлорохина. Несмотря на ограниченную антимикробную активность, хинолоны стали основой для синтеза налидиксовой кислоты в 1962 году [26]. Следующие три поколения хинолонов - фторхинолоны, были позже получены путем химической модификации. В настоящее время хинолоны являются третьим по частоте использования классом антибиотиков после макролидов и β -лактамов [27]. Антимикробный эффект этого класса антибиотиков обеспечивается за счёт ингибирования таких ферментов, как ДНК-гираза и топоизомеразы II и IV, препятствуя таким образом репликации, что вызывает гибель как у грамположительных, так и у грамположительных бактерий.

Методика полного синтеза β -лактамных антибиотиков позволила создать подклассы карбапенемов и монобактамов, имеющих важное значение для терапии инфекционных заболеваний. Карбапенемы имеют схожую химическую структуру с пенициллинами и отличаются наличием двойной связи между атомами C2 – C3 и заменой серы в положении C1 на углерод, что обеспечивает улучшенную антибактериальную активность и лучшую устойчивость к действию β -лактамаз. Учитывая, что карбапенемы обладают самым широким спектром активности среди β -лактамов, включая резистентные патогены, они в настоящее время являются первым средством при лечении мультирезистентных инфекций [28]. Монобактамы также, как и карбапенемы обладают лучшей стабильностью к действию β -лактамаз. Эти моноциклические β -лактамы были введены в клинику в 1984 году с созданием азтреонама, первого антибиотика этого подкласса. В настоящее время разрабатываются различные производные азтреонама, основанные на присоединении различных сидерофоров [29]. Такой подход основан на стратегии троянского коня, чтобы использовать механизм поглощения железа бактериальной клеткой для облегчения проникновения через мембрану грамотрицательных бактерий.

Другой класс полностью синтетических антибиотиков – оксазолидиноны, делится на две группы, различающиеся по механизму антибактериального действия. Первая группа блокирует биосинтез клеточной стенки и ее основным представителем является вторичный метаболит циклосерин, открытый в 1952 году, который в настоящее время производится синтетическими методами. Циклосерин по-прежнему востребован при лечении мультирезистентного туберкулеза. Другая группа оксазолидинонов была открыта в 1984 году и проявляет антимикробную активность за счет ингибирования трансляции. Антибактериальные свойства соединений этой группы были известны еще в 1970-х годах, и исследователи компании DuPont Pharmaceuticals синтезировали ряд производных в качестве потенциальных противомикробных препаратов для использования у млекопитающих [30,31]. Несмотря на активность *in vitro*, антимикробные препараты этой группы были слишком токсичны при системном приеме и не использовались в клинической практике, пока не было синтезировано относительно безопасное производное линезолид. Хотя об устойчивости к линезолиду не сообщалось, его ограниченная эффективность против грамположительных бактерий и токсичность при длительном лечении ограничивают его терапевтическое использование в качестве крайней меры против мультирезистентных патогенов.

Химический синтез вместе с тотальным синтезом антимикробных соединений послужил катализатором зарождения эры медицинской химии, которая вместе с использованием платформы Ваксмана дала миру большинство клинически значимых антибиотиков, характеризующихся улучшенной эффективностью против бактерий и нивелированными побочными эффектами, что позволило человечеству одержать верх над инфекционными заболеваниями в 20 веке.

1.5. Появление геномики: целевой скрининг

Во время Золотого века антибиотиков, полученных в основном из вторичных метаболитов бактерий, были открыты многочисленные антибактериальные препараты. Однако отдача от традиционных платформ скрининга, основанных на культивации, со временем уменьшалась, все чаще происходило переоткрытие антибиотиков, и конвейер производства новых антибактериальных соединений на основе вторичных метаболитов иссяк [32]. Неуклонный и повсеместный рост устойчивости бактерий к антибиотикам в сочетании с сокращением открытия новых препаратов привел к так называемому «кризису антибиотиков», в результате чего ВОЗ объявила возможное наступление «пост-антибиотической эры» [33]. В дополнение к разработке альтернативных способов антибактериальной терапии отчаянно требовались новые антибиотики.

Потребность в новой стратегии по времени совпала с эпохой геномики, которая оказала огромное влияние на методы разработки антибиотиков и сформировала новые высокотехнологичные платформы. В эпоху геномики (1995–2004 года) общее количество секвенированных бактериальных геномов увеличилось с 3 до более чем 200 [34], а в эпоху постгеномики (2004–2014 года) достигло 30 000 [35].

Вторичные метаболиты синтезируются ферментами, которые кодируются генами, объединяющимися в кластеры генов биосинтеза. В эпоху высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа стало очевидно, что бактериальные геномы содержат в своем составе большое количество кластеров генов биосинтеза, что позволяет предположить, что они обладают потенциалом продуцировать намного больше вторичных метаболитов, чем было идентифицировано с помощью обычного скрининга, основанного на культивации [32].

Соотнесение известных вторичных метаболитов с их кластерами биосинтеза позволило определить особенности организации кластеров генов биосинтеза. Эти данные позволили создать специализированные

биоинформатические инструменты для идентификации кластеров генов биосинтеза в составе геномов бактерий и грибов, такие как antiSMASH [36] и PRISM [37]. Теперь достаточно информации, закодированной в последовательности ДНК, для предсказания биосинтеза вторичных метаболитов, их класса и, во многих случаях, структуры [32,38].

Постоянное совершенствование технологий высокопроизводительного секвенирования позволяет не только значительно снизить стоимость прочтения целого генома, но и повысить качество получаемых данных. Появилась возможность получать последовательность целой хромосомы в одном контиге, необходимость собирать геном из сотен коротких контигов постепенно исчезла [39].

Исследование микроорганизмов из экзотических сред обитания также позволяет значительно расширить разнообразие кластеров генов биосинтеза, и тем самым увеличить вероятность обнаружения ранее неизвестных классов антибиотиков и новых представителей открытых классов антибиотиков [40].

Совокупность описанных выше подходов позволяет создать «краткий список» потенциально новых кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов для дальнейшего их изучения, например, путем скрининга штаммов-продуцентов на основе активности [41]. Остается проблема того, как идентифицировать *in silico* те кластеры генов биосинтеза, которые с наибольшей вероятностью отвечают за биосинтез соединений, которые функционируют как антибиотики. Одним из распространенных методов решения данной проблемы является поиск новых членов уже известных классов антибиотиков. Этого можно достичь путем поиска кластеров генов со схожей архитектурой организации кластера, а также схожей последовательностью генов. При этом должно наблюдаться достаточно различий между ферментами биосинтеза, чтобы обеспечить синтез новых химических соединений. Благодаря такому подходу были идентифицированы рифамицин-подобные кластеры генов биосинтеза,

содержащих дополнительные гены, которые кодируют новые ферменты модификации, и выделены новые антибиотические соединения этого класса, демонстрирующие новый механизм действия и большую устойчивость к ферментам резистентности [42]. Благодаря *in silico* детектированию синтаз нерибосомных пептидов, которые используют определенные аминокислоты для биосинтеза вторичных метаболитов, были выделены новые катионные пептиды, которые проявляют высокую ингибирующую активность в отношении грамотрицательных бактерий [43].

Еще одна методология поиска новых кластеров генов биосинтеза основана на идентификации ферментов резистентности в составе кластера. В основе этого подхода лежит тот факт, что микробные продуценты антибиотиков должны обеспечивать себя механизмом саморезистентности, например, путем продукции транспортных белков, модифицирующих ферментов или белков, связывающих антибиотик. При поиске кластеров генов биосинтеза совместно с ассоциированными генами резистентности значительно увеличивается вероятность того, что синтезируемая таким кластером молекула может быть антибиотиком [44,45]. Также была разработана программа «Antibiotic Resistant Target Seeker», которая основана на наблюдении, что дубликации основных генов «домашнего хозяйства», могут обеспечивать саморезистентность [46]. Этот подход позволяет не только идентифицировать возможные кластеры генов биосинтеза, кодирующие антибиотики, но также прогнозировать возможную мишень и механизм действия антибиотика. Таким образом подход, основанный на идентификации механизма саморезистентности, позволяет априори делать вывод о функции вторичного метаболита.

Было замечено, что кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов, которые не удавалось идентифицировать с помощью традиционного скрининга на основе культивации, имеют низкий уровень экспрессии, или не экспрессируются в лабораторных условиях [47].

Неспособность обнаружить продукты этих так называемых «молчащих» кластеров генов биосинтеза может быть связана с контролем транскрипции или трансляции, или недостатком молекул-предшественников или кофакторов. Увеличение чувствительности масс-спектрометрических методов и эффективности сравнительной ЖХ/МС играет важную роль в области разработки новых антибиотиков [38,48–50].

Существует две возможности идентификации продукта биосинтеза новых кластеров генов: можно получить кодируемую молекулу в нативном штамме, в котором она была идентифицирована, или проводить молекулярное клонирование кластера генов биосинтеза и гетерологическую экспрессию. Генетические манипуляции с дикими штаммами могут быть сложными и трудоемкими. Кроме того, обнаружение продукции новых молекул, особенно тех, которые имеют низкий уровень продукции, может быть сложной задачей на фоне продукции других вторичных метаболитов, включая уже открытые антибиотики.

Новые кластеры генов биосинтеза идентифицируются в геномах бактерий из экзотических источников, например в геномах морских микроорганизмов, экстремофилов или эндофитов [38]. Такие штаммы чаще всего являются некультивируемыми в лабораторных условиях или не поддаются генетическим манипуляциям. Поэтому гетерологическая экспрессия зачастую является более эффективным подходом для решения этих проблем. Была показана возможность биосинтеза вторичного метаболита, кодируемого «молчащим» кластером генов, в гетерологическом хозяине [51,52]. Кроме того, использование гетерологического хозяина позволяет обнаруживать новые вторичные метаболиты благодаря дифференциальному анализу между хозяином с интересующим кластером генов биосинтеза и без него. Такой подход позволяет решить проблему «маскировки» исследуемых вторичных метаболитов другими соединениями [51,53].

Однако гетерологическая экспрессия имеет свои ограничения и не обязательно бывает успешной во всех случаях или у всех гетерологических хозяев [54–57]. Наконец, даже когда удается достичь гетерологической экспрессии, выход продукта может быть значительно ниже, чем у нативного штамма, если метаболизм или регуляторная система хозяина не соответствует требованиям кластера генов биосинтеза [54]. Решением данной проблемы может служить выбор в качестве гетерологического хозяина бактерию той же самой таксономической группы, что и нативный штамм-продуцент [51,57–63].

За период с 2017 по 2019 годы было идентифицировано по крайней мере шесть новых противомикробных молекул с помощью такого подхода к поиску кластеров генов биосинтеза (Таблица 1).

Таблица 1. Примеры новых антибиотиков, идентифицированных с помощью биоинформатического анализа генома за 2017 – 2019 года. NRPS - нерибосомальная пептидная синтаза, PKS-I - поликетидсинтаза I типа, PKS-II - поликетидсинтаза типа II. Адаптировано из [64].

Антибиотик	Класс молекулы	Механизм действия	Спектр активности	Метод идентификации
Бревицидин и латероцидин	NRPS	Разрушение мембраны	Грамотрицательные	Биоинформатическое предсказание кластеров генов биосинтеза NRPS
Пиксидилицилин	PKS-II	Ингибирование топоизомеразы IV	Грамположительные	Идентификация механизма саморезистентности

Малацидин	NRPS, циклический липепеп- тид	Связывание липидов II	Грамположи- тельные, резистентные к ванкомицину и β -лактамам	Биоинформатич- еский анализ геномов
Канглеми- цин	PKS-I, семейств о ансамблиц нов	Ингибиро- вание РНК- полимеразы	Грамположи- тельные, резистентные к рифампицину	Поиск специфических ферментов биосинтеза
Формиками- цин	PKS-II	Не сообщается	Грамположи- тельные, резистентные к ванкомицину и β -лактамам	Анализ геномов бактерий- симбионтов муравьев
Аурора- мицин	PKS-I, макро- лактамы	Не сообщается	Грамположител- ьные, резистентные к ванкомицину и β -лактамам	Активация экспрессии "молчащих" кластеров генов биосинтеза

Благодаря совокупности различных подходов к идентификации новых кластеров генов биосинтеза в геномах разнообразных микроорганизмов, а также методов экспрессии продукции неисследованных вторичных метаболитов и возможности детектировать эти новые молекулы открываются совершенно новые возможности для открытия новых антибактериальных препаратов.

1.6. Ультравысокопроизводительный микрофлюидный скрининг

Не смотря на все достижения в области высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа метагеномных и метаболомных данных, данные методы дают лишь вероятностное представление об антибактериальной активности микроорганизмов, имеющих в своем геноме кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов. В то же время классические методы на основе культивирования штаммов, хоть и дают более подробную информацию о биологической

активности бактериальных штаммов, являются трудозатратными и часто приводят к переоткрытию уже известных антибиотиков, а также не позволяют исследовать некультивируемые штаммы.

Использование микрофлюидных технологий для изучения микроорганизмов имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими платформами скрининга, использующими чашки Петри и микропланшеты, или биоинформатическими методами.

Первое, наиболее очевидное преимущество, которое дает инкапсуляция микроорганизмов в каплях — это изоляция отдельных клеток от общего числа бактерий в отдельной капле [65]. Ограничение роста в небольшом объеме питательной среды внутри капли позволяет клетке быстрее накапливать вторичные метаболиты, а также другие секретируемые молекулы, создавая подходящее микроокружение. Эта особенность открывает такие возможности, как детектирование секретируемых молекул и культивирование “некультивируемых” штаммов.

Вторая уникальная для капельной микрофлюидики особенность — это способность оперировать и анализировать огромное количество ($\sim 10^8$) отдельных капель [66]. Эта особенность дает возможность изучать фенотипические и генетические маркеры, такие как наличие определенного гена в составе генома или экспрессия определенного белка, отдельных клеток или небольших популяций, и позволяет производить высокопроизводительный скрининг и клеточный сортинг с помощью флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (FACS) с последующим отбором клеток с желаемыми свойствами из гетерогенной популяции.

Третье наиболее значимое преимущество заключается в возможности проведения последовательных операций над каплями, позволяющее создавать более сложные экспериментальные протоколы. Автоматизированные микрофлюидные системы позволяют контролировать

образование капель [67,68], объединять их между собой, смешивать с дополнительными реагентами, сортировать по выбранному признаку и даже инкубировать на протяжении многих поколений в течение длительного времени. Эта особенность даёт возможность, например, проводить несколько измерений над одними и теми же каплями [69–71] или отслеживать эволюцию популяции в контролируемых меняющихся химических средах [72].

Микрофлюидная капельная платформа впервые была использована для оценки ферментативной активности бактерии в работе [73], где было проведено измерение активности щелочной фосфатазы, экспрессируемой в периплазму штаммом *E. coli* BL21 (DE3). Поскольку антибактериальной активностью обладают не только низкомолекулярные соединения, но также и ферменты, такие как лизоцим или лизостафин [74], то возможность проводить скрининг на основе ферментативной активности отдельной клетки может позволить отобрать наиболее активные формы антибактериальных ферментов. Такие мутанты могут сыграть важную роль в создании альтернативных методов антибактериальной терапии, замедляя размножение бактерий или разрушая создаваемые микроорганизмами биопленки.

Микрофлюидная капельная платформа также даёт возможность прямого анализа и обнаружения бактериальных генов и геномов. Микроорганизмы можно отсортировать по определенной последовательности ДНК. С помощью технологии ПЦР в реальном времени в каплях была проведена амплификация конкретных последовательностей генов инкапсулированных бактерий [75]. Флуоресцентный сигнал, генерируемый в процессе ПЦР, позволял сортировать и проводить дальнейший анализ капель, содержащих бактерии с желаемой последовательностью ДНК (рис. 4). Использование данного метода может позволить изолировать отдельные штаммы из образца определенной микробиоты, имеющие в своем геноме гены резистентности, ассоциированные с кластерами генов биосинтеза.

В другой работе инкапсуляция в капли обеспечивала равномерную амплификацию геномов, как показано на отдельных клетках *E. coli* [76]. Полногеномная амплификация (WGA) необходима при метагеномном секвенировании популяции бактерий, поскольку дает возможность идентифицировать кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов даже у некультивируемых бактериальных штаммов [77,78] с низким содержанием геномной ДНК в образце. Проведение WGA перед метагеномным секвенированием решает такие проблемы, как неполная амплификация и пробелы в покрытии генома.

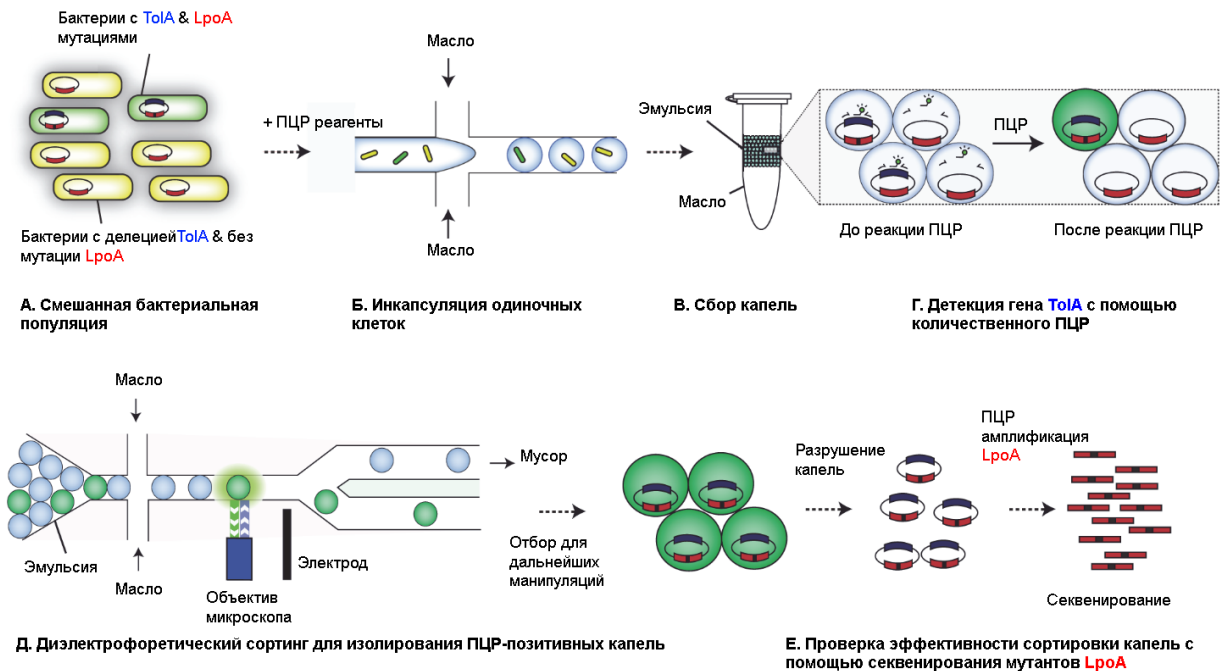


Рисунок 4. Рабочая схема PACS (ПЦР-активированный клеточный сортинг) применительно к модельной микробной системе. **А.** Микробный образец, состоящий из *E. coli* K-12, несущих ген *tolA* дикого типа и мутант $\Delta tolA$. **Б.** Затем этот образец инкапсулируют вместе с реагентами для ПЦР с образованием эмульсии. **В.** После чего эту эмульсию собирают и **Г.** подвергают термоциклированию, при этом ПЦР-положительные капли накапливают флуоресцентный зонд Taqman. **Д.** Затем проводят диэлектрофоретический сортинг на наличие флуоресцентного сигнала от

капель. Е. Капли разрушают и секвенируют геномное содержимое. Адаптировано из [75].

Автоматизированная микрофлюидная платформа была использована для скрининга капель, содержащих коктейли из различных антибиотиков, и демонстрации особенностей эпистатических взаимодействий между антибиотиками и штаммом *E. coli* [79]. Автоматизация позволила быстро переносить капли в устройство, содержащее встроенный спектрофотометр, где измеряли жизнеспособность бактериальных клеток, минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков и эпистатические взаимодействия между антибиотиками (рис. 5).

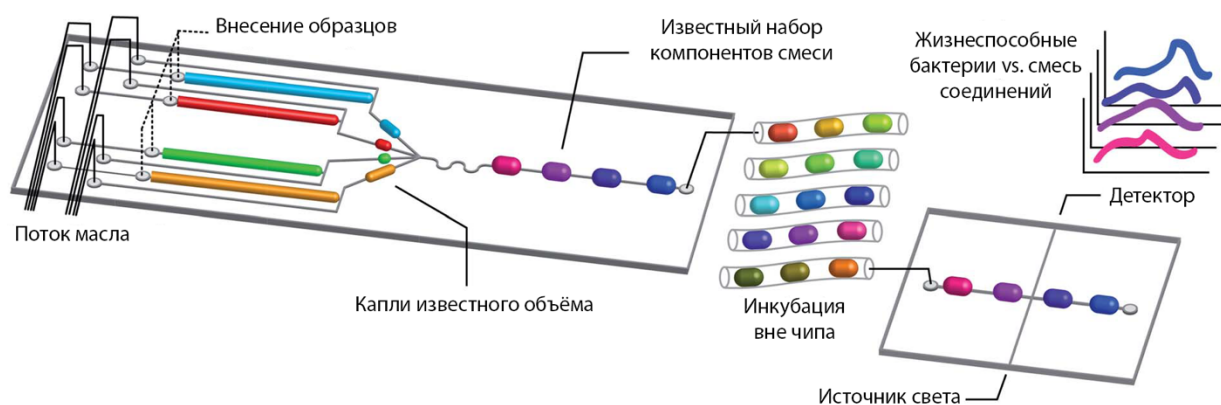


Рисунок 5. Схема, отражающая принцип работы микрофлюидной системы. Сгенерированный набор капель известного объема объединяются для создания капель с определенным химическим составом. Последовательность капель, образованных в устройстве, хранится в полиэтиленовых трубках и инкубируется вне чипа. После инкубации капли загружаются в микроканал, соединенный с источником света и спектрофотометром через оптические волокна, где измеряется оптическое поглощение и, следовательно, концентрация присутствующего реагента и плотность бактериальных клеток. Адаптировано из [79].

Микроорганизмы способны реагировать на различные факторы, влияющие на их выживание, рост и размножение, такие как дефицит питательных веществ, стресс и воздействие антибиотиков. Такие воздействия

могут спровоцировать бактерии адаптироваться к новой среде для обеспечения их выживания и стимулировать продукцию вторичных метаболитов. Стандартные методы измерения метаболической активности включают быстрое охлаждение, лизис клеток и масс-спектрометрию. Метаболомный анализ отдельных капель, содержащих инкапсулированные бактерии является нетривиальной задачей для масс-спектрометрии. Тем не менее была показана возможность идентификации вторичных метаболитов в каплях пиколитрового объема при наличии внутри капель порядка 10 клеток отдельного штамма [80]. Исследователям удалось идентифицировать 5 различных вторичных метаболитов в лабораторных штаммах с помощью ВЭЖХ в тандеме с гибридной масс-спектрометрией с применением квадрупольного орбитрэп и электроспрея. Таким образом было показано, что идентификация вторичных метаболитов в каплях ограниченного объема является трудоемкой, но выполнимой задачей.

Одной из основных задач современной микробиологии в целом, а также области поиска новых антимикробных соединений, является идентификация условий, которые обеспечивают рост «некультивируемых» бактерий [81]. Капельная микрофлюидная платформа может обеспечить выгодные преимущества для подбора таких условий путем изолирования отдельных клеток в каплях и низкого расхода питательной среды для культивирования, в которую обычно добавляют экстракт из среды обитания исследуемого организма. Было представлено модифицированное устройство SlipChip для целевого культивирования бактерий [82]. На первом этапе отдельные клетки из смешанных образцов окружающей среды были стохастически заключены в капли, чтобы исключить возможную конкуренцию в процессе роста различных видов. После инкубации каждая капля была разделена на две капли, и каждая помещалась на отдельном чипе. Впоследствии одну «половину» капли можно проанализировать с помощью деструктивного анализа (например, ПЦР), в то время как жизнеспособные колонии на соответствующем чипе можно инокулировать для макромасштабной

культуры [82]. Подбор подходящих условий культивации является краеугольным камнем в процессе исследований новых «некультивируемых» микроорганизмов с целью идентификации вторичных метаболитов. Таким образом возможность высокопроизводительного подбора условий культивации таких микроорганизмов позволяет более эффективно анализировать бактерии из различных источников на наличие продукции вторичных метаболитов.

Известно, что продукция бактериями вторичных метаболитов может индуцироваться в ответ на молекулярные сигналы из внешней среды [83]. Микроорганизмы общаются, секретируя и воспринимая внеклеточные молекулы, продуцируемые одним и тем же или разными видами. Данное явление называется чувством кворума, которое заключается в особенном саморегулируемом поведении микроорганизмов при высокой плотности клеток в ограниченном объеме [84]. Микрофлюидная технология является полезным инструментом для изучения передачи клеточных сигналов на уровне отдельных клеток, поскольку она позволяет принудительно воссоздать микроокружение с высокой плотностью клеток за счет заключения одной клетки в каплю. Для определения способности воспроизвести чувство кворума бактерий, небольшое количество клеток штамма *Pseudomonas aeruginosa* были инкапсулированы в микрофлюидных компартментах [85]. Приблизительно 20% отдельных клеток *P. aeruginosa*, 40% двух клеток и 100% более 7 клеток, заключенных в капли, инициировали чувство кворума. Индуцированное инкапсуляцией чувство кворума способствует обнаружению сигнальных путей медленно растущих или даже «некультивируемых» штаммов, а также стимулирует продукцию вторичных метаболитов. Возможность активировать экспрессию «молчащих» кластеров генов биосинтеза является ключевой в процессе поиска новых антимикробных соединений.

Как уже было сказано, микрофлюидная инкапсуляция отдельных клеток бактериального сообщества в капли двойной эмульсии (MDE) с последующим FACS является привлекательной платформой для исследователей, поскольку позволяет изолировать интересующие штаммы, не разрушая при этом клетки. Однако усовершенствование этого метода позволила создать принципиально новую платформу скрининга бактерий на наличие антибиотической активности. Метод заключается в коинкапсулировании отдельных клеток образца микробиоты вместе с репортерными бактериями-патогенами в каплях двойной эмульсии вода-масло-вода [86]. В результате чего можно проводить отбор таких капель, в которых происходит ингибирование роста бактерии-патогена под действием клетки-эффектора. Благодаря этому, исследователи могут сразу изолировать штаммы на основе их антибактериальной активности по отношению к репортерному патогену, а последующие этапы секвенирования и аннотирования генома дают детальную информацию о наличии кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов (рис. 6).

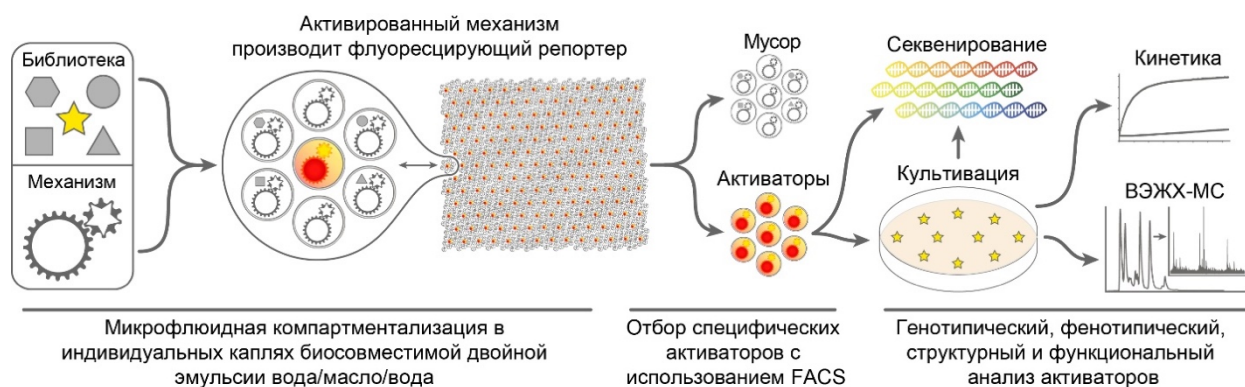


Рисунок 6. Генерация двойной микрофлюидной эмульсии методом последовательной эмульсификации в микрофлюидных чипах. Адаптировано из [86].

Возможности платформы показаны на примере системы совместного культивирования штаммов в микрофлюидных каплях двойной эмульсии (рис. 7), где в качестве репортерного патогена выступает *Staphylococcus*

aureus, а в качестве потенциального эффектора выступают бактерии *E. coli* и *Streptomyces venezuelae* [86].

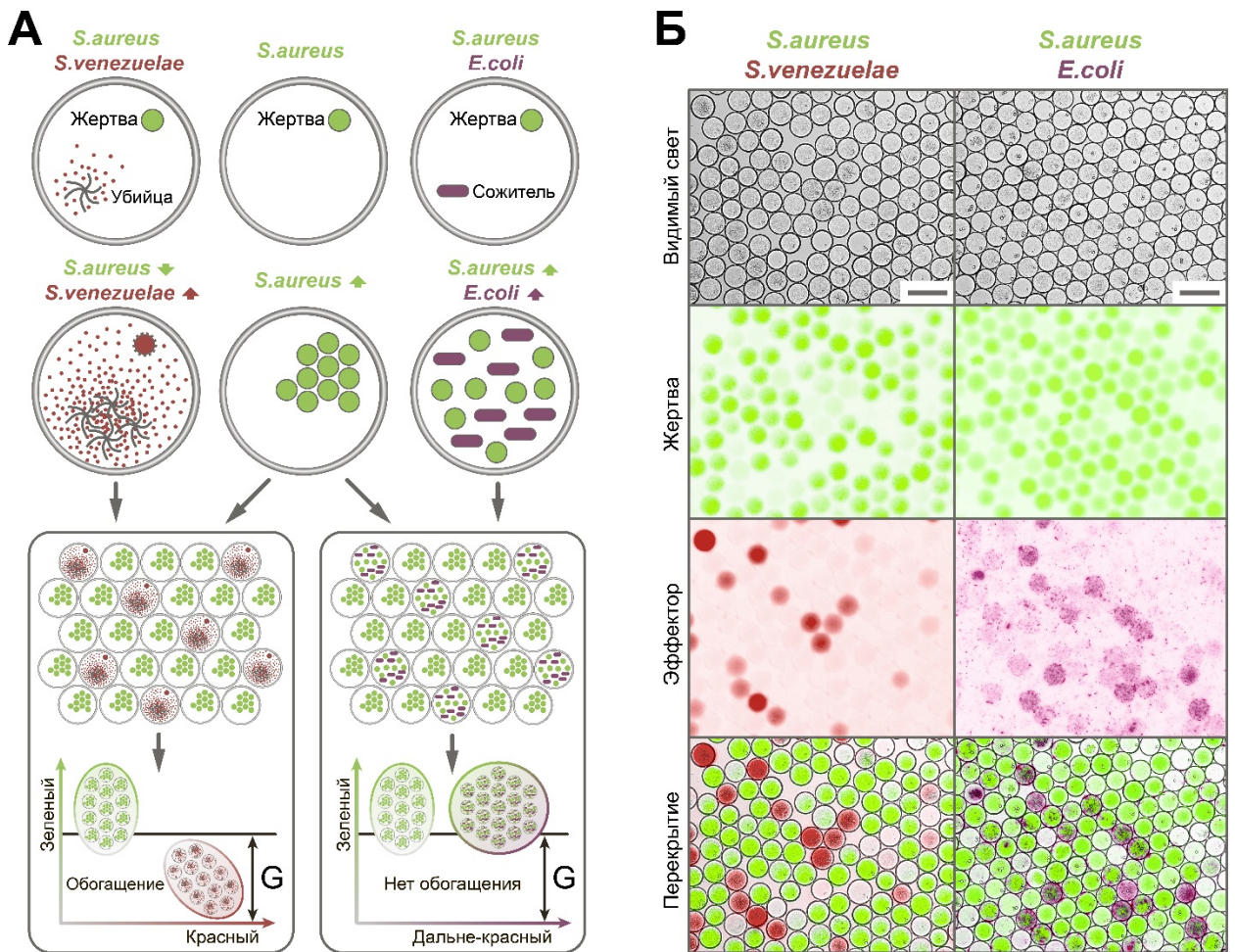


Рисунок 7. А. Схема скрининга попарных взаимодействий для отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, в каплях биосовместимой двойной микрофлюидной эмульсии. **(Б)** Микроскопия капель, несущих смесь клеток *S. aureus* + *S. venezuelae* и *S. aureus* + *E. coli*. Изображения получены с помощью микроскопии видимого света, флуоресцентной микроскопии зеленой флуоресценции *S. aureus* (мишень), красной флуоресценции *S. venezuelae* (эффектор слева) и дальне-красной флуоресценции *E. coli* (эффектор справа), а также их общего наложения (перекрытие). Адаптировано из [86].

Описанная выше схема скрининга попарных взаимодействий в каплях может быть модифицирована дополнительными флуоресцентными

сигналами-репортерами, которые позволяют избежать проблем, связанных с отбором пустых капель и капель с изначально низким количеством клеток *S. aureus* (рис. 8)

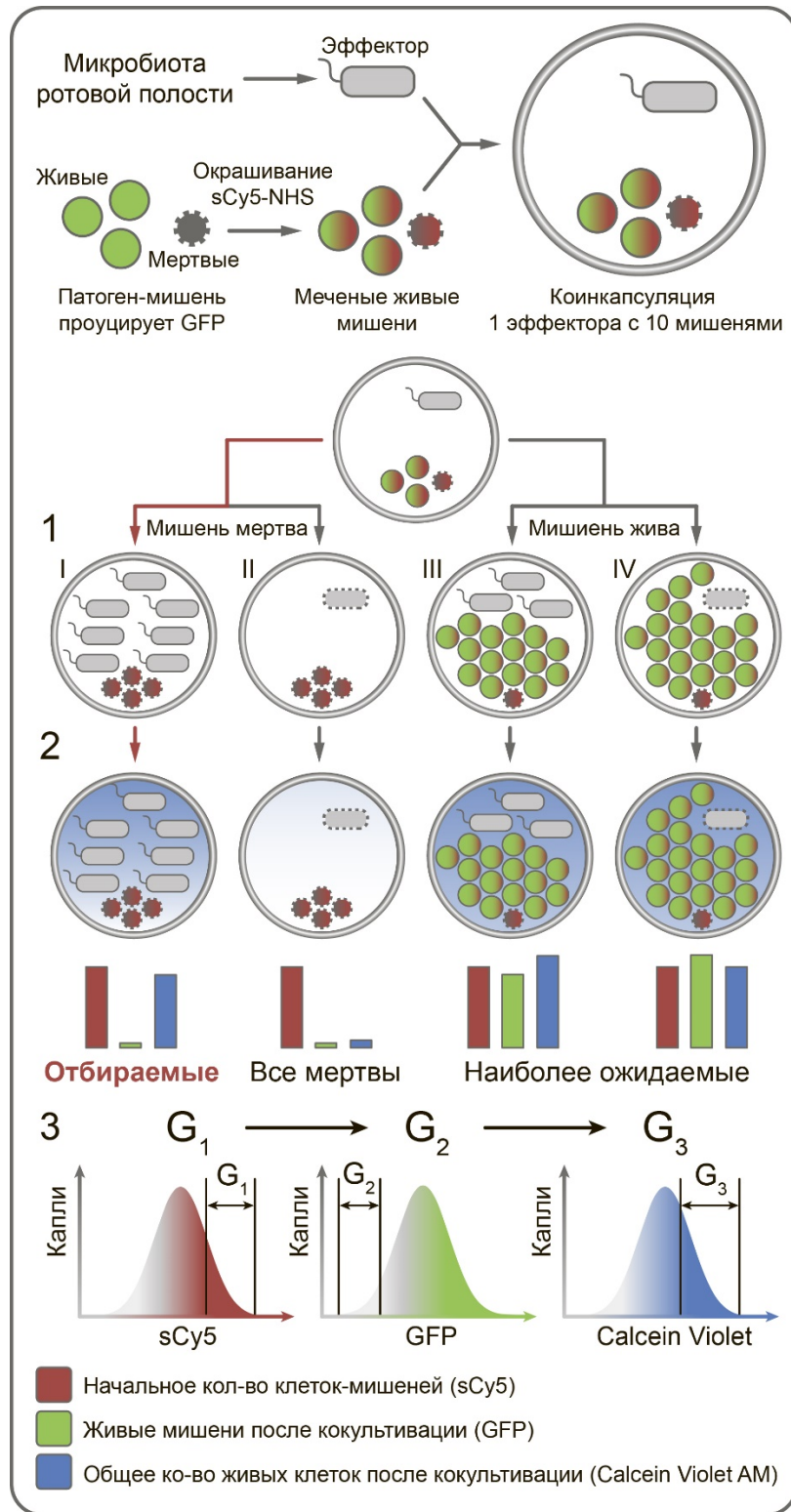


Рисунок 8. Усовершенствованная схема отбора бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, среди представителей микробиоты ротовой полости человека. Адаптировано из [86].

Прижизненное мечение клеток *S. aureus* перед их непосредственной коинкапсуляцией с представителями исследуемой микробиоты и последующая окраска эмульсии красителем Calcein Violet AM после инкубации позволяют добиться максимального обогащения микробиоты бактериями, способными ингибировать рост *S. aureus*.

Платформа MDE – FACS обеспечивает важную связь между генотипом и его метаболической функцией на уровне единственной клетки из образца микробиоты, обеспечивая таким образом преимущество микрофлюидной платформы в процессе поиска продуцентов новых антибиотиков. Изолирование капель, в которых содержатся штаммы, ингибирующие репортерный патоген, и их последующее полногеномное секвенирование вместе с биоинформатическим анализом позволяет также идентифицировать кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов.

Данный подход позволяет изолировать не только культивируемые микроорганизмы, но и, что более важно, некультивируемые микроорганизмы, проявляющие антибактериальную активность, что является невозможной задачей для классических микробиологических методов. Таким образом, расширенные возможности данной микрофлюидной платформы позволили вплотную подойти к широкоформатному скринингу обширных микробиологических сообществ и были впервые применены нами для скрининга микробиоты ротовой полости бурого сибирского медведя *Ursus arctos collaris*. Возможности данной платформы по изолированию и характеристике отдельных клонов бактерий микробиоты *Ursus arctos collaris* были в полной мере реализованы на генетическом уровне и привели к анализу генетического кластера антибиотика амикумацина, а также позволили раскрыть биохимические пути регуляции активности данного антибиотика на молекулярном уровне.

2. Материалы и методы

2.1. Химические реактивы и сопутствующие материалы

В работе использовались следующие реактивы и материалы:

2.1.1. Реактивы:

трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{Na}_2[\text{B}_2\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, ЭДТА, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NaCl , KCl , MgCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, АТФ, АДФ, диметил сульфоксид ДМСО, HEPES, MES, PEG 200, PEG 2000 MME, бромистый этидий, β -меркаптоэтанол, Tween 20, BSA, α -D-глюкоза, α -D-лактоза моногидрат, N-ацетил-D-глюкозамин, D-глюкозамин-6-фосфат, сахароза, D-сорбит, DL-серин, DL-треонин, DL-тирозин, хлорид холина, аминометилпропанол, 3-диметиламино-1-пропанол, N-метил-D-глюокамин, D-(+)-гидрохлорид глюкозамина, D-(+)-галактозамина гидрохлорид, канамицин, этаноламин, 3-амино-1-пропанол, 4-амино-1-бутанол, глицин получены из SigmaAldrich, США; акриламид, N',N'-метиленабисакриламид, додецилсульфат натрия, мочевины; агар, пептон, триптон, дрожжевой экстракт (BD, США); изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид ИПТГ (Thermo Fisher Scientific, США); металлохелатный сорбент Ni-NTA (Qiagen, Германия), MonoQ, Superdex75; метанол, биотин (Sigma, США), глюкоза, глицерин, LiCl (Sigma, США), дитиотреитол ДТТ (Sigma, США); имидазол (Sigma, США); N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (Amresco, США); аминокислоты: глутаминовая кислота, метионин, лизин, лейцин, гистидин (Sigma, США); минеральное масло (Sigma, США); набор силиконовых эластомеров Sylgard® 184 (Dow Corning, США), пептиды YAS-NH₂, YLS-NH₂, YS-NH₂, PSW-NH₂, NS-NH₂, Ac-PSW-NH₂, Ac-ISW-NH₂, Ac-RSW-NH₂, NSL-NH₂, NSLY-NH₂, SL-NH₂ и SLY-NH₂ были синтезированы GeneCust, Франция.

2.1.2. Ферменты:

термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза Taq (Евроген, Россия) и Encyclo (Евроген, Россия); щелочная фосфатаза (Thermo Fisher Scientific, США); РНКазы А (Thermo Fisher Scientific, США); эндонуклеазы рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.3. Маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы:

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 кДа (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.4. Поверхностно-активные вещества и модификаторы:

Abil EM 180 (Evonik, Германия); Pico-Surf 2, 2% в HFE-7500 (Dolomite, Великобритания), Pluronic F-127 (Sigma, США); поливиниловый спирт Mowiol 23-88 (Kuraray Specialities Europe, Германия), трихлор(октадецил)силан (Sigma, США), Aquapel (PPG Industries, США).

2.1.5. Плазмидные вектора:

DHFR (NEB, США); pKatushka2S-B (Евроген, Россия), pHT01 (AddGene, USA).

2.1.6. Бактериальные штаммы:

E. coli XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]* (Евроген, Россия); *E. coli* BW25113 Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787*(::*rrnB-3*), λ^- , Δ *tolC732*::*kan*, *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514* был любезно предоставлен проф. Сергиевым П.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия); *Staphylococcus aureus*, конститутивно продуцирующий зеленый флуоресцентный белок за счет экспрессии гена GFPuv под SAR1 промотором, был любезно предоставлен проф. Ильиной Е.Н. (ФНКЦ ФХМ, Россия) Штаммы *Bacillus subtilis* 168 Δ *yerI*, *Bacillus subtilis* 168 Δ *yerI* pHT-

AmiN и *Bacillus subtilis* 168 *DyerI* pHT-AmiO, экспрессирующие ферменты AmiN и AmiO, были любезно предоставлены д.б.н. Светланой Дубилей (Институт биологии гена, Москва).

2.1.7. Клеточные линии:

HEK-293T (ATCC, США).

2.1.8. Растворы

Все растворы готовились на особо чистой воде из установки Milli-Q (Millipore, США). Растворы для микрофлюидной компартиментализации (за исключением суспензии клеток) подвергались фильтрации с использованием фильтров с диаметром пор 0.22 мкм.

PBS: 8.0 г/л NaCl, 0.2 г/л KCl, 1.15 г/л Na₂HPO₄, 0.2 г/л KH₂PO₄, pH 7.2.

10xTBE: 0.89 М Трис, 0.89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8.0.

TE: 10мМ Трис-HCl, 1мМ ЭДТА, pH8.0.

2.1.9. Бактериальные среды

LB: 10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

2xYT: 16 г/л пептона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl.

2xYT-агар: 2xYT, 18 г/л агара.

SOB: 20 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

SYC: 40 г/л сахарозы, 5 г/л дрожжевого экстракта, 4 г/л CaCO₃, 1.5 г/л

K₂HPO₄, 2 г/л глюкозы, 2 г/л NaCl, 1.5 г/л MgSO₄, 2 г/л (NH₄)₂SO₄, 0.01 г/л

FeSO₄, 0.01 г/л MnCl₂

2.1.10. Антибиотики

Раствор натриевой соли ампициллина (Синтез, Россия) в воде с концентрацией 100 мг/мл (1000X), водный раствор сульфата канамицина (Sigma, США) 100 мг/мл (1000X), спиртовой раствор хлорамфеникола (Sigma, США) 50 мг/мл, водный раствор генетицина (Thermo Fisher Scientific, США) 100 мг/мл и водный раствор зеоцина (Thermo Fisher Scientific, США) с концентрацией 100 мг/мл.

2.2. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

2.2.1. Амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью термоциклера T100 (BioRad, США). Готовили инкубационную смесь следующего состава:

однократный буфер для Taq-полимеразы (Евроген, Россия);

10 пмоль каждого праймера (Евроген, Россия);

0.2 мМ смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (Thermo Fisher Scientific, США);

1-2 ед. Taq-полимеразы (Евроген, Россия),

0.1-0.2 мкг ДНК.

Амплификацию проводили в объеме одной реакции 20-50 мкл по следующей схеме:

А

предварительная денатурация 94°C, 1 мин.

1 цикл.

Б

денатурация 94°C, 15 сек.

отжиг праймеров X°C, 30 сек.

элонгация 72°C, Y сек (рассчитывалась исходя из длины ампликона с учетом скорости элонгации ≈1000 пар/мин).

25-30 циклов.

В

элонгация 72°C, 5 мин.

1 цикл

2.2.2. Рестрикция

Рестрикцию ПЦР-продуктов проводили в течение 2 часов при температуре 37°C. При рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут инкубации добавляли щелочную фосфатазу до конечной концентрации 1 мкг/мл.

2.2.3. Лигирование

Для лигирования использовали T4 ДНК-лигазу (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:1, в течение 1 часа температуре 22°C. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадителя), обрабатывали равным объемом смеси 1:1 фенол-хлороформа, и пересаждали водную фазу 3 объемами этанола. Центрифугировали 10 минут 16000 g при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 6 мкл воды.

2.2.4. Выделение плазмидной ДНК

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 10 мл среды 2xYT с добавлением селектирующего антибиотика и растили при 37°C, перемешивании 220-250 об/мин, в течение 18-22 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 4000 g. Для выделения и дополнительной очистки плазмидной ДНК, использованной для проведения трансформации бактерий и трансфекции, были использованы наборы для выделения и очистки методом колоночной хроматографии (Евроген, Россия).

2.2.5. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 1% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 5:1 с буфером нанесения, содержащим 10 мМ Трис-HCl pH 7.6, 0.03% бромфенолового синего, 0.03% ксиленцианола, 60% глицерина и 60 мМ ЭДТА. Электрофорез проводили в буфере TBE при напряжении 120 В. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе (ЛКВ, Германия).

2.2.6. Секвенирование плазмидной ДНК

Для секвенирования плазмиды добавляли 1 мкл РНКазы А и инкубировали 15 минут при 37°C. После чего добавляли 25 мкл 2 М NH₄OAc и 75 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 16000 g и 0°C. Осадок дважды промывали 900 мкл солевого спирта, подсушивали и растворяли в 20 мкл TE. Секвенирование плазмидной ДНК проводили в компании Евроген, Россия.

2.2.7. Создание генетических конструкций, кодирующих киназы

AmiN и hAmiN и фосфатазу AmiO

Гены *amiN* и *amiO* амплифицировали из геномной ДНК *B. pumilus* 124, а ген *hAmiN* из геномной ДНК *B. pumilus* 123 с помощью ПЦР, используя праймеры (Приложение 1). Амплифицированные фрагменты ДНК клонировали в плазмиду DHFR Control Template (NEB) с использованием сайтов рестрикции *NdeI/KpnI*, что привело к получению векторов pIvi-AmiN, pIvi-hAmiN и pIvi-AmiO.

2.3. Методы работы с бактериями *E. coli*

2.3.1. Получение электрокомпетентных клеток

Клетки высевались из музея методом истощающего штриха на чашку Петри с 2YT-агаром без антибиотика после чего инкубировались 14 часов при 37°C. Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды 2xYT и растили при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи.

Ночную культуру в объеме 1 мл высевали в две двухлитровые бутылки, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили в течение 1.5-2 часов при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин до оптической плотности 0.4 ОЕ при длине волны 600 нм. Затем клетки охлаждали на льду и стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл после чего центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 0°C на центрифуге Beckman J-21.

Клетки ресуспендировали в небольшом объеме ледяной стерильной воды MQ, добавляли около 150 мл ледяной воды MQ и центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем клетки отмывали охлажденным 10% глицерином. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные пробирки, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой pUC19 и принималась равной количеству выросших колоний поделенной на количество плазмиды в мкг.

2.3.2. Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации

Электропорация проводилась на приборе ECM600 (ВТХ, США) с использованием 1 мм кювет (BioRad, США). К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную лигазную смесь, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (1.2-1.4 кВ, 5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC и инкубировали 30 минут при 37°C. Далее высевали на чашку Петри с LB-агаром, с добавлением

селектирующих антибиотиков, и помещали в термостат на 37°C на 14-16 часов.

2.3.3. ПЦР с колоний

В микропробирки разносили по 10 мкл воды MQ, после чего отдельные бактериальные колонии (в количестве 10-20 штук) переносили с использованием предварительно автоклавированных стерильных зубочисток на свежую размеченную чашку и в соответствующую пронумерованную пробирку. Готовили двукратную смесь для проведения ПЦР и разносили ее по пробиркам с инокулированными колониями в объеме 10 мкл. Далее на приборе T100 (BioRad, США) осуществляли 25 циклов ПЦР-амплификации, после чего продукты полимеразной цепной реакции анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле.

2.3.4. Ночная культура

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 10 мл среды 2xYT с соответствующим селектирующим антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина или 25 мкг/мл зооцина) и растили при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи.

2.3.5. Приготовление музейного штамма

Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, замораживали и хранили при температуре -80°C. Штамм из музея рассеивали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду 2xYT-агар и инкубировали при 37°C в течение 14-16 часов.

2.4. Методы работы с бактериями рода *Bacillus*

2.4.1. Продукция и очистка антибиотика амикумацина

Амикумацин А (Ami) имеет систематическое название (2S, 3S, 4S)-4-амино-2,3-дигидрокси-N-[(1S)-1-[(3S)-8-гидрокси-1-оксо-3,4-дигидроизохромен-3-ил]-3-метилбутил] гександиамид. Штамм-производитель амикумацина *B. pumilus* 124 культивировали в питательной среде SYC при 28°C. *B. pumilus* 124 инокулировали из ночной культуры с использованием разведения 1: 100 и культивировали в течение 40 часов в колбах Эрленмейера на 750 мл в объеме 100 мл при постоянном перемешивании 250 об/мин. Бактериальную среду с клетками центрифугировали при 10000g в течение 10 мин, после чего супернатант фильтровали с использованием Millistak + HC Pod Depth Filter (Millipore). Очистка Ami включает три стадии хроматографической очистки. На первом этапе супернатант очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ на сорбенте LPS-500 (Техносорбент) на колонке XK 26 (GE Healthcare Life Sciences) с использованием буфера А (10 мМ NH₄OAc pH 5.0, 5% ACN) и буфера Б (10 мМ NH₄OAc pH 5.0, 80% ACN); скорость потока 6 мл/мин. Элюцию проводили с использованием ступенчатого градиента 0-10 мин (0% Б), 10-20 мин (20% Б), 20-36 мин (35% Б) и 36-45 мин (100% Б). Фракции, содержащие амикумацин (35% Б), лиофилизировали, растворяли в ДМСО и фракционировали на колонке Zorbax ODS 62x250 мм (Agilent) с помощью ОФ-ВЭЖХ с использованием буфера А и Б; скорость потока 5 мл/мин; градиент 0-10 мин (0% Б), 10-12 мин (0-40% Б), 12-16 мин (40-52% Б), 16-17,5 мин (52-67% Б), 17,5-19 мин (67 - 100% Б). Наконец, Ami очищали на колонке Symmetry C18 5 м, 4,6 × 150 мм (Waters) с помощью ОФ-ВЭЖХ с использованием буфера А и Б; скорость потока 1 мл/мин; градиент 0-3 мин (0% Б), 3-4 мин (0-30% Б), 4-11 мин (30-37% Б), 11-12 мин (37-100% Б). Время выхода амикумацина и его производных контролировали по поглощению при длине волны 315 нм, концентрацию Ami измеряли с использованием $\varepsilon_{315\text{нм}}^{\text{MeOH}}=4380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5. Методы работы с клетками линии НЕК293Т

2.5.1. Культивирование клеток линии НЕК293Т

Клетки выращивали в среде Advanced DMEM (Gibco, США), содержащей 10% австралийской бычьей фетальной сыворотки (Gibco, США), 4 мМ дипептида GlutaMAX и смесь антибиотиков и антимикотика (Gibco, США) в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ во флаконах (25 см²). При достижении конfluence клетки рассеивали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного PBS (Gibco, США), добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина в изотоническом буфере и инкубировали 2–3 мин при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, после чего клетки рассеивали по 0.5-1 мл суспензии в 5 мл свежей ростовой среды.

2.6. Методы работы с белками

2.6.1. Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бис-акриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис-НСl, рН 6.8; разделяющий гель – 8-10% смеси акриламид-бис-акриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис-НСl, рН 8.9. Для полимеризации сначала добавляли TEMED до концентрации $5 \cdot 10^{-5}\%$, а затем персульфат аммония до концентрации $1.5 \cdot 10^{-4}\%$. Для проведения нативного ПААГ-электрофореза использовали буферные растворы без ДСН.

Двукратный буфер нанесения образцов: 4% ДСН, 0.25 М Трис-НСl, рН 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, рН 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего; (для проведения электрофореза в восстанавливающих условиях добавляли 5% меркаптоэтанола; для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН).

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-НСl 6.5 г/л, рН 8.3 (для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН рН 7.4).

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 15 минут при 95°C, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

2.6.2. Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до полного исчезновения фонового окрашивания.

2.6.3. Продукция и очистка киназ AmiN и hAmiN

Рекомбинантные белки AmiN и hAmiN экспрессировались в клетках *E. coli* BL21 (DE3) с использованием протокола автоиндукции [87]. Культивацию проводили в среде, содержащей 3,3 г/л (NH₄)₂SO₄, 6,8 г/л KH₂PO₄, 13,4 г/л Na₂HPO₄·7H₂O, 0,5% глицерина, 0,05% α-D-глюкозы, 0,2% α-D-лактозы и 1 мМ MgCl₂ в течение 20 часов при 30°C для продукции AmiN и в течение 48 часов при 16°C для продукции hAmiN. Клетки центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин и ресуспендировали в 50 мМ

Трис-НСl, 100 мМ КСl, 2,5% глицерина, рН 8.0 (40% мас./об.). Затем суспензии клеток лизировали с помощью соникации: 15 сек включенным импульсом и 15 сек с выключенным импульсом в течение 10 мин, 60% мощности на приборе Sonicator 3000 (Misonix). Лизат центрифугировали при 30000 g в течение 30 мин, после чего супернатант подвергали хроматографической очистке на ионообменном и эксклюзионном сорбенте. Анионообменная хроматография проводилась с использованием колонки Mono Q 10/100 GL (GE Healthcare Life Sciences); буфер А (20 мМ Трис-НСl, 50 мМ КСl, 2,5% глицерин, рН 8.0) и буфер Б (20 мМ Трис-НСl, 1 М КСl, 2,5% глицерин, рН 8.0); скорость элюции составляла 3 мл/мин, градиент 0-10 мин (0% Б), 10-26 мин (0-32% Б), 26-28 мин (32 - 100% Б). Эксклюзионную хроматографию проводили с использованием колонки Superdex 75 HiLoad 26/600 (GE Healthcare Life Sciences); скорость элюции составляла 3 мл/мин, 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ КСl, 2,5% глицерин, рН 8.0. Наконец, фракции, содержащие рекомбинантные белки, подвергали диафильтрации и концентрированию с использованием Amicon Ультра-15 10К (Millipore).

2.6.4. Получение кристаллов киназ AmiN и hAmiN

Кристаллы AmiN и hAmiN выращивали при температуре 19°C с помощью метода подвесной капельной диффузии пара. Все образцы белков центрифугировали при 16000 g за 10 мин перед кристаллизацией. Кристаллы чистой AmiN были получены смешиванием 1 мкл белка с концентрацией 25 мг/мл и равного объема кристаллизационного раствора, содержащего 0,1 М Трис-НСl рН 8.5 и от 2,5 до 2,65 М сульфата аммония. Комплекс AmiN с АТФ кристаллизовался в аналогичных условиях с предварительным смешиванием белка и АТФ с конечной концентрацией 10 мМ. В обоих случаях кристаллы появлялись в течение 12-24 часов. Для кристаллизации AmiN в комплексе с АМР-РNP, Mg²⁺ и Ami, белок с конечной концентрацией 70 мг/мл был смешан с АМР-РNP, Ami и MgCl₂ до конечной концентрации 10, 3.6 и 20 мМ соответственно. Кристаллы получали смешиванием 1 мкл раствора

белкового комплекса и 1 мкл кристаллизационного раствора, содержащего 0,1 М Трис-НСl pH 8.5, 1,1 М LiCl и 27,5% (мас./об.) ПЭГ 4000. Эти кристаллы появлялись в течение 3 - 5 дней. В случае hA*mi*N белок с конечной концентрацией 40 мг/мл смешивали с АМР-РNP, А*mi* и MgCl₂ или CaCl₂ до конечной концентрации 2.2, 2 и 20 мМ соответственно. Кристаллы hA*mi*N получали с использованием 1 мкл раствора белкового комплекса и 1 мкл раствора для кристаллизации, содержащего 0,1 М MES pH 6.5, 0.2 М ацетата натрия и от 27 до 29% (мас./об.) PEG 2000 MME. Кристаллы появлялись в течение 2-3 дней.

2.6.5. Измерение кинетических параметров ферментов А*mi*N и hA*mi*N

Фосфорилирование амикумаина (А*mi*) проводили в реакционном буфере, содержащем 50 мМ HEPES-KOH pH 7.5, 100 мМ KCl и 0,01% BSA. Зависимость скорости реакции от концентрации А*mi* измеряли при температуре 30°C в следующих условиях: 1 мМ АТФ, 1 мМ MgCl₂, концентрация фермента 0.01 нМ для концентраций амикумаина от 20 нМ до 200 нМ, и 0.1 нМ фермента для концентрации амикумаина от 200 нМ до 10 мкМ. Зависимость скорости реакции от концентрации АТФ измеряли в условиях с 30 мкМ до 10 мМ АТФ, 1 мМ MgCl₂, 1 мкМ А*mi* и 0.1 нМ А*mi*N при температуре 30°C. Зависимость скорости реакции от концентрации Mg²⁺ измерялась в условиях 0.05 до 100 мМ MgCl₂, от 0.2 до 0.4 мМ АТФ, 1 мкМ А*mi* и 0.1 нМ А*mi*N при 30°C. Металл-зависимость скорости реакции фосфорилирования амикумаина киназами А*mi*N и hA*mi*N измеряли с использованием 10 мМ АТФ, 10 мМ Me²⁺, 1 мкМ А*mi* и 0.1 нМ фермента при температуре 30°C. Реакционные смеси анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Symmetry C18, 5 мкм, 3,9 × 150 мм. (Waters) с использованием буфера А (10 мМ NH₄OAc pH 5.0, 5% ACN) и буфера Б (10 мМ NH₄OAc pH 5.0, 80% ACN); скорость элюции 1 мл/мин; градиент от 0 до 1 мин (0% Б), от 1 до 11 мин (от 0 до 67% Б) и от 11 до 11.5 мин (от 67 до 100% Б) на

хроматографе Chromaster (Hitachi). Выход амикумацина и его фосфорилированного продукта детектировали с помощью флуориметра Chromaster ($\lambda_{Ex} = 317$ нм и $\lambda_{Em} = 469$ нм). Скорости реакции были измерены в трех независимых повторностях. Константы K_M и k_{cat} рассчитывались с использованием кинетики Михаэлиса-Ментен в условиях концентрации Ami от 20 до 200 нМ и $[ATP \cdot Mg^{2+}] \gg [Ami]$. Кинетические константы определялись с использованием программного обеспечения Prism 7 (GraphPad).

2.6.6. Измерение термодинамических параметров связывания ферментов $AmiN$ и $hAmiN$ с субстратами

Термодинамические параметры связывания АТФ, АДФ, Ami с киназой $AmiN$ и Ami , фосфорилированный Ami с комплексом $AmiN \cdot ATP$ измеряли с помощью метода изотермической титрационной калориметрии с использованием калориметра MicroCal iTC200 (GE Healthcare Life Sciences, США) при температуре 25°C в буферном растворе, содержащем 20 мМ Бис-Трис-Пропан-НСl, 50 мМ КСl, 2.5% глицерина и 2 мМ $MgCl_2$ (или 2 мМ $CaCl_2$) рН 8.5. Аликвоты лигандов объемом 2,5 мкл вводили в ячейку прибора объемом 0,2 мл, содержащую раствор белка для достижения системой полной изотермы связывания. Для каждого эксперимента использовались 20 мкМ белковый раствор в ячейке и 250 мкМ лиганд в шприце для титранта. В случае комплексов $AmiN \cdot ATP$, образцы содержали 20 мкМ фермента и 50 мкМ АМР-РNP или АДФ. Теплота разведения измерялась после инъекции лиганда в буферный раствор; полученные данные были вычтены из теплоты реакции для расчета эффективной теплоты связывания. Все измерения проводились в трех независимых экспериментах. Полученные кривые титрования были аппроксимированы и проанализированы с использованием программного обеспечения Microcal Origin, предполагая наличие только одного сайта связывания. Константы связывания (K_a) и изменение энтальпии

(ΔH) были измерены в ходе эксперимента, а изменение энтропии (ΔS) было рассчитано из уравнения: $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$

2.6.7. Измерение активности киназ AmiN и hAmiN по отношению к различным субстратам

Активность киназ AmiN и hAmiN по отношению к панели различных субстратов оценивалась с помощью кита Fluorometric Universal Kinase Assay Kit ab138879 (Abcam), который основан на количественном определении концентрации АДФ, высвободившегося в процессе реакции фосфорилирования. Панель субстратов включала следующие химические соединения: N-ацетилглюкозамин, глюкозамин-6-фосфат, глюкоза, сахароза, сорбит, глицерин, 2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол (трис), серин, треонин, тирозин, MBP, YAS-NH₂, YLS-NH₂, YS-NH₂, PSW-NH₂, холин, аминометил пропанол, 3-диметиламино-1-пропанол, N-метил-D-глюкамин, глюкозамин, галактозамин, канамицин, этаноламин, 3-амино-1-пропанол, 4-амино-1-бутанол, NS-NH₂, Ac-PSW-NH₂, Ac-ISW-NH₂, Ac-RSW-NH₂, NSL-NH₂, NSLY-NH₂, SL-NH₂ и SLY-NH₂. В Реакцию фосфорилирования проводили в буферном растворе, содержащем 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM АТФ, 10 mM MgCl₂ и 10 mM субстрата вместе с 0.2 мкМ ферментов. Реакционные смеси инкубировали при температуре 30°C в течение 30 мин, после чего анализировали с помощью кита ab138879 (Abcam) в режиме измерения кинетики с использованием прибора Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Скорости реакции $v/[E]$ были определены в трех повторностях и проанализированы с помощью множественного t-критерия в программном обеспечении Prism 7 (GraphPad).

2.6.8. Измерение киназной активности AmiN по отношению к пептидам

Скрининг библиотеки пептидов проводили в 1536-луночных планшетах, как описано в [88], за исключением того, что пептиды переносили из планшетов вручную. Каждая лунка содержала 2,45 мкл реакционной смеси, содержащей 0,3 мг/мл AmiN и 50 мкМ пептида в 50 мМ Трис- HCl pH 7.5, 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА, 0,1% Tween 20, 80 мкг/мл BSA, 45 мкМ [γ - ^{32}P] АТФ (10 мкКи/мл). Пептиды имели общую последовательность Y-A-x-x-x-x-S/T-x-x-x-x-A-G-K-K-биотин, где «x» означает эквимольную смесь из 17 протеиногенных аминокислот, исключая Цис, Сер и Тре, а S/T означает равную смесь Сер и Тре. В каждой лунке одна в каждой конкретной позиции «x» была зафиксирована одна из 20 аминокислот. Планшеты с реакционными смесями инкубировали в течение 2 часов при температуре 30°C, аликвоты объемом 200 нл из каждой лунки переносили на мембрану, покрытую стрептавидином SAM2 (Promega). Мембраны промывали, как описано ранее [89] и сушили. Присоединение радиоактивного фосфора к пептиду количественно оценивали с помощью Phosphorimager (Typhoon, GE). Интенсивность радиоактивного сигнала нормализовались так, что среднее значение сигнала в конкретном положении в пептиде было приравнено к 1. Средние нормализованные значения из трех отдельных экспериментов были преобразованы в логарифм \log_2 и отображены в виде тепловой карты с использованием Microsoft Excel.

2.7. Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга антимикробной активности

2.7.1. Отбор представителей микробиоты, ингибирующих рост *S. aureus*

Образцы микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris* были получены в результате соскоба с десен и подъязычной складки. Полученные бактерии были ресуспендированы в

среде YTP для кокультивации, отмыты, профильтрованы с использованием фильтров А-313 с размером пор 20 мкм (IDEX, США) и разведены до 0.8 ОЕ600 ($\lambda \approx 0.5$ по результатам предварительных экспериментов). Клетки-мишени *S. aureus*, продуцирующие флуоресцентный белок-репортер GFP, полученные в логарифмической фазе роста, были проинкубированы с 5 мкМ активированного эфира sulfo-Сyanine5 NHS (Lumibrobe, Россия) в течение 1 часа в PBS с 0.2% глюкозы. После инкубации клетки отмывали 3 раза средой YTP, фильтровали, разводили до 0.1 ОЕ600 ($\lambda = 10$) и подвергали микрофлюидной инкапсуляции вместе с суспензией клеток микробиоты с использованием 60 мкм чипов. После 16 часов инкубации при 35°C, к эмульсии добавляли Calcein Violet AM (Thermo Fisher Scientific, США) до финальной концентрации 10 мкМ. Спустя 30 минут капли с высоким уровнем флуоресценции sCy5, низким уровнем GFP и высоким Calcein Violet были отобраны с использованием каналов эмиссии флуоресценции 660/20, 530/30 и 450/50 нм соответственно.

2.7.2. Регенерация и идентификация культивируемых бактерий-ингибиторов *S. aureus*

Бактериальные клоны были регенерированы в процессе высевания на чашки с YPT-агаром. Индивидуальные бактериальные колонии переносили на подложку MALDI target plate (MSP 96 ячеек; Bruker Daltonics, США) и покрывали 2 мкл насыщенного раствора матрицы α -4-циано-гидроксикоричной кислоты (Bruker Daltonics, США) в 50% ацетонитриле (Sigma, США) и 2.5% трифторуксусной кислоте (Sigma, США). Масс-спектрометрические профили были получены с использованием прибора Microflex (Bruker Daltonics, США). Пики молекулярных ионов измерялись автоматически в линейном режиме положительно заряженных ионов с оптимальным диапазоном от 2000 до 20000 масса/заряд. Программное обеспечение flexControl 3.0 (Bruker Daltonics, США) и flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, США) было использовано для обработки результатов. Анализ

спектров и идентификация были проведены при помощи MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, США) с использованием библиотеки MALDI Biotyper 3.0 library (версия 3.2.1.1).

2.7.3. Отбор бактерий-ингибиторов *S. aureus* с использованием классических микробиологических подходов скрининга на чашках (платформы Ваксмана)

Образцы микробиоты ротовой полости высевали на чашки с YTP-агаром в различных десятикратных разведениях. Спустя 48 часов культивации при 35°C чашки, содержащие 30-100 колоний, были использованы для дальнейшего анализа. Индивидуальные колонии были пронумерованы и переколоты на новую чашку со свежей средой, старая чашка покрывалась теплым слоем LB с 0.7% агара и клетками *S. aureus* с оптической плотностью 0.01-0.03 OЕ₆₀₀. После 16 часов инкубации при 35°C некоторые колонии демонстрировали появление ореола зон просветления. Клоны, обладавшие наибольшим радиусом зон просветления, были отобраны для дальнейших исследований.

2.7.4. Измерение ингибирующих свойств метаболитов в жидкой культуре

Измерение ингибирующих свойств проводилось как для суспензий отобранных бактерий-ингибиторов, так и для ростовых сред, полученных в результате их культивации в течение 48 часов в среде YTP при 35°C, стерилизованных методом стерильной фильтрации с использованием шприцевых фильтров с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США). Бактерии-ингибиторы и их ростовые среды были разведены методом двукратных серийных разведений в плашке 96-луночного планшета в среде YTP с клетками *S. aureus* с оптической плотностью 0.03 OЕ₆₀₀. После 16 часовой инкубации при 35°C и перемешивании 200 об/мин рост *S. aureus*

анализировался путем измерения флуоресценции GFP ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=488/513$ нм), а также оптической плотности при длине волны 600 нм с использованием прибора Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США).

2.7.5. 16S рРНК секвенирование бактерий

Популяции капель до и после отбора подвергались лиофилизации с использованием прибора FreeZone (Labconco, США). Суммарная ДНК была выделена с использованием набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, США). Библиотеки ампликонов были получены с использованием праймеров 341F

(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCW
GCAG) и 801R

(GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTA
TCTA ATCC) согласно методике 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B, Illumina, США). Секвенирование библиотек и анализ полученных данных производился с использованием генетического анализатора MiSeq (Illumina, США) и набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов, Illumina, США) согласно инструкции производителя. Уровень фона 300 прочтений соответствовал количеству прочтений в контрольном образце без капель. Полученное количество прочтений для каждого рода бактерий было нормировано на общее количество прочтений в образце. Специфическое обогащение было рассчитано как отношение нормированного количества прочтений после и до отбора с учетом сигнала фона.

2.7.6. Полногеномное секвенирование бактерий

Популяции капель до и после отбора подвергались лиофилизации с использованием прибора FreeZone (Labconco, США). Суммарная ДНК была выделена с использованием набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, США). Полногеномная амплификация проводилась с использованием набора

EPLI-g Single Cell Kit (Qiagen, США). Библиотека фрагментов была получена с использованием набора Ion Xpress Plus Fragment Library Kit и Ion Xpress Barcode Adapters 1–16 Kit (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование библиотек производилось с использованием генетического анализатора Ion Proton (Life Technologies, США) и наборов ION PI HIQ Sequencing 200 Kit и Ion P1TM Chip Kit v2 (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Полученные результаты подвергались биоинформатическому анализу с использованием двух различных алгоритмов Metaphlan2 и CLARK с целью таксономической классификации видов бактерий-ингибиторов (Приложение 3). Полученное количество прочтений для каждого вида бактерий было нормировано на общее количество прочтений в образце. Уровень фона 0.005%, соответствовавший нормированному количеству прочтений в контрольном образце без капель, был добавлен к каждому нормированному количеству прочтений. Специфическое обогащение было рассчитано как отношение нормированного количества прочтений после и до отбора с учетом фона.

2.8. Методы структурного анализа

2.8.1. Разрешение структуры на основе данных рентгеноструктурного анализа

Рентгеновские данные были собраны на накопителе PETRA III (DESY, Гамбург, Германия), по каналам связи EMBL P13 и P14 с использованием детекторов PILATUS2 6M-F и EIGERX 16M (Dectris, Баден, Швейцария) соответственно. Кристаллы собирали и остекловывали прямым переносом в поток азота при температуре 100К. Кристаллы AmiN без лигандов подвергали криопротекции с помощью добавления 25% об./мас. PEG 200 перед витрификацией. Структура AmiN была определена методом одиночной аномальной дифракции. Кристалл AmiN был пропитан 1М бромидом калия, и данные собирались при поглощении на пиковой длине волны К-края

бромида. Фазы определялись с помощью программ SHELXC/D/E и HKL2MAP. Первоначальная модель, построенная программой ARP/WARP, использовалась для молекулярной замены в программе MOLREP на исходные данные AmiN. Модель AmiN была доработана и разрешена несколькими раундами ручного построения модели в Coot и доработана в Refmac5. Структуры комплексов AmiN и hAmiN с лигандами были разрешены методом молекулярной замены в программе MOLREP и разрешены в Coot и Refmac5. B-факторы были нормализованы для каждой структуры независимо друг от друга, чтобы учесть их индивидуальный уровень мобильности и тем самым обеспечить возможность сравнения. Нормализованный B-фактор был рассчитан как стандартизованная оценка, основанная на необработанных значениях B-фактора, по формуле:

$$b_i = \frac{B_i - \mu}{\sigma}$$

где B_i - исходное значение B-фактора i -го атома; μ и σ - среднее и стандартное отклонение исходных B-факторов атомов индивидуальной структуры соответственно.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Скрининг микробиоты с целью идентификации штаммов, проявляющих антимикробную активность

Разработанная ранее микрофлюидная платформа [86] была использована для скрининга микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris* (рис. 9). Данный подход основан на инкапсуляции отдельных клеток микробиоты с репортерными патогенными бактериями *S. aureus*, продуцирующими флуоресцентный белок. При этом микрофлюидные технологии обеспечивают коинкапсуляцию микробиоты и патогенов в каплях биосовместимой двойной эмульсии вода-масло-вода.

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.

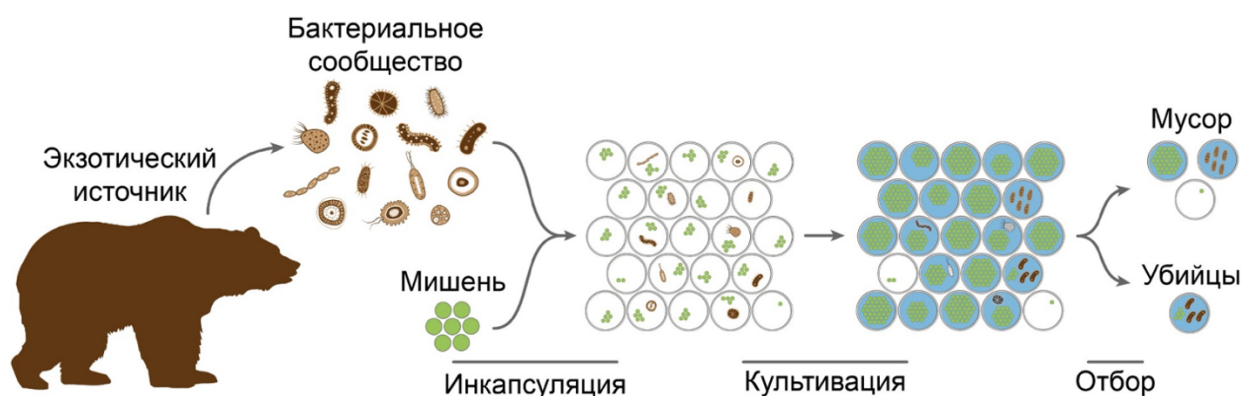


Рисунок 9. Схема идентификации бактерий из микробиоты ротовой полости сибирского медведя, проявляющих антимикробную активность против бактерии-мишени *S. aureus*, с использованием ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы. Отдельные клетки микробиоты ротовой полости коинкапсулировались совместно с патогенной бактерией, продуцирующей флуоресцентный репортерный белок GFP. После совместного кокультивирования в каплях бактерии окрашивали и сортировали для отбора капель с высокой начальной загрузкой

патогенными бактериями, с низким уровнем сигнала зеленой флуоресценции и высокой метаболической активностью

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. Несколько бактериальных клонов с такой активностью были идентифицированы как *Enterococcus casseliflavus*, *Weissella confusa* и *Bacillus pumilus*. В дальнейшем исследование будет сосредоточено на штамме *B. pumilus* 124, так как он проявил наиболее выраженные антибактериальные свойства.

3.2. Исследование антимикробной активности штамма *B. pumilus* 124

Изолированный с помощью ультравысокопроизводительного микрофлюидного скрининга штамм *B. pumilus* 124, проявляющий антибактериальную активность по отношению к патогенной бактерии *S. aureus*, был исследован с целью идентификации биологически активных метаболитов. С помощью ОФ-ВЭЖХ фракционирования питательной среды, в которой культивировался штамм *B. pumilus* 124, было выделено и очищено вещество, проявляющее антимикробную активность против патогенного *S. aureus*. Мы установили, что антимикробная активность штамма *Bacillus pumilus* 124 обусловлена продукцией трансляционного ингибитора амикумацина, подавляющего синтез белка в про- и эукариотах.

Для оценки антибактериального потенциала амикумацина и его потенциального использования *in vivo* требовался метод эффективной продукции антибиотика штаммом *B. pumilus* 124. Было установлено, что продукция амикумацина штаммом *B. pumilus* 124 не является конститутивной, на продукцию Ami значительно влияет аэрация и культивация в тонком слое жидкости, обеспечивающая формирование биопленки и обеспечивающая образование межклеточных взаимодействий. Так что культивация в среде SYC, содержащей микрочастицы карбоната кальция, обеспечивает увеличение продукции амикумацина более чем в 8 раз, по сравнению с культивацией в среде 2YT (рис 10).

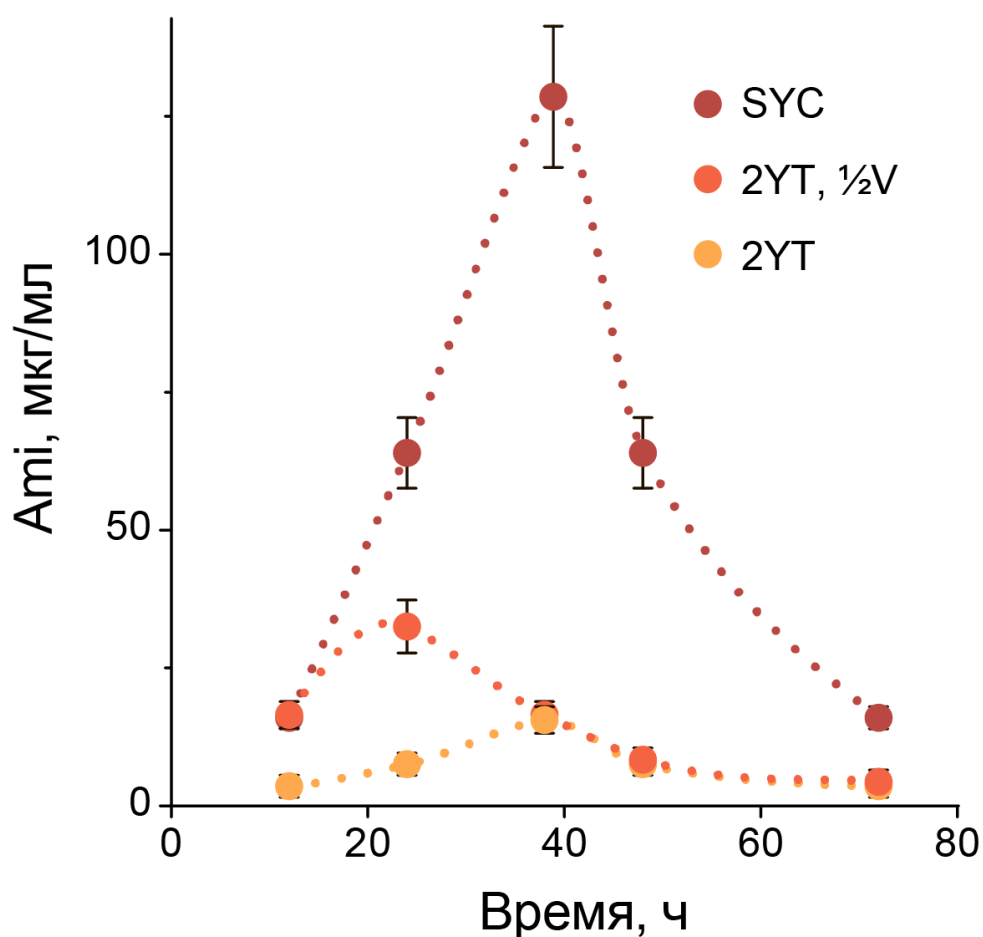


Рисунок 10. Культивация штамма *B. pumilus* 124 в среде SYC, 2YT и вдвое уменьшенном объеме среды 2YT. Концентрацию амикумацина (точки) оценивали с помощью анализа антибактериальной активности

культуральной среды в микропланшетах в трех независимых повторностях. Данные представляют среднее значение \pm SD

Такие условия культивации позволяют производить Am_i для использования в микробиологических и биохимических исследованиях. Последующее выделение и очистка амикумацина осуществляется с помощью твердофазной экстракции на полимерном сорбенте, модифицированном полидивинилбензолом (LPS-500, Техносорбент, Россия), и двумя стадиями ОФ-ВЭЖХ на Symmetry C18 сорбенте (Waters, США) (рис. 11).

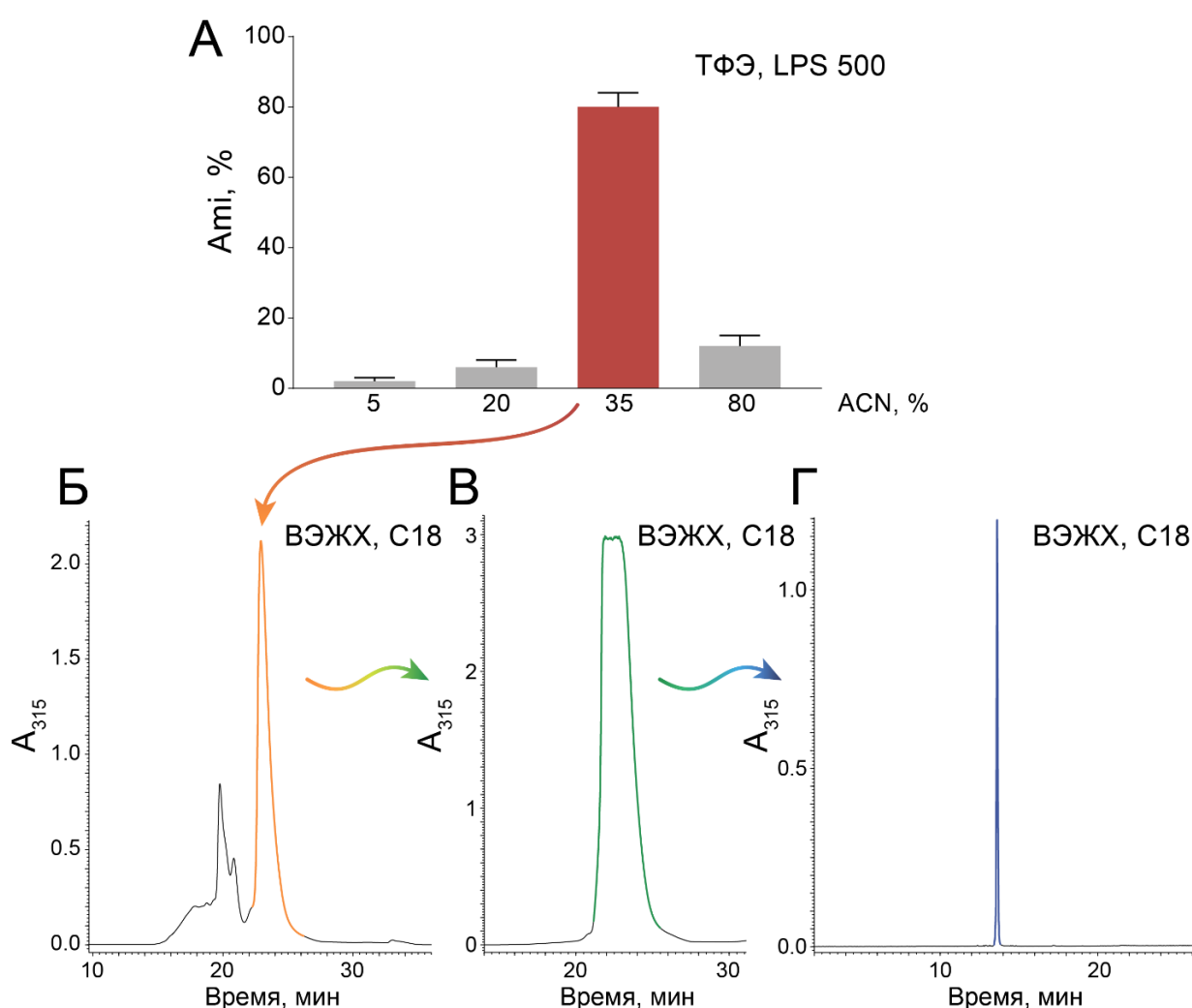


Рисунок 11. Оптимизированный процесс очистки амикумацина из бактериальной среды. А. Стадия твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием полимерного сорбента, модифицированного полидивинилбензолом. Элюция проводилась с применением ступенчатого градиента и фракция, содержащая максимальное количество Am_i,

использовалась в дальнейшей очистке. **Б, В.** Хроматограммы последовательных стадии очистки фракций, содержащих Am_i, с помощью ОФ-ВЭЖХ на C18 сорбенте. **Г.** Хроматограмма образца очищенного препарата Am_i. Выход амикумацина на стадии ТФЭ измерялся в трех повторностях. Данные представляют среднее значение \pm SD

Для исследования спектра активности амикумацина нами была разработана технология глубокого функционального профилирования, позволяющая персонализировано 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 последующим метагеномным секвенированием выживших бактерий в каплях с целью их идентификации. 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. 12).

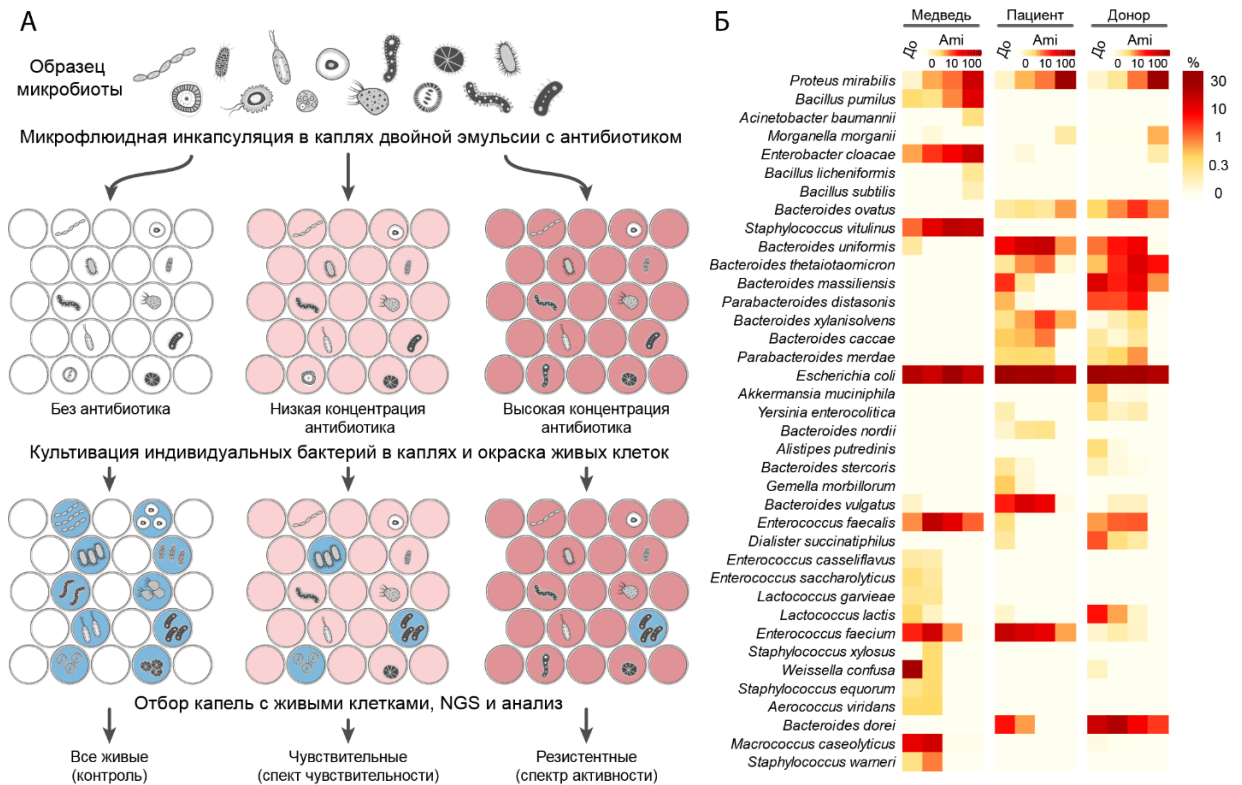


Рисунок 12. А. Иллюстрация принципа оценки спектра активности антибиотика с использованием высоко гетерогенной популяции бактерий и технологии глубокого функционального профилирования. **Б.** Тепловая карта иллюстрирует долю каждого вида бактерий в образце и ее изменение под действием амикумацина, а также влияние Ami на различные образцы микробиоты: микробиота ротовой полости сибирского медведя (медведь), фекальная микробиота людей, больных колитом (пациент) и здоровых доноров (донор). Данные были получены (до) и после скрининга с помощью микрофлюидной платформы, то есть после культивирования отдельных клеток микробиоты в каплях с различными концентрациями амикумацина (0, 10 и 100 мкг/мл), отбора капель с живыми бактериями, инкапсулированных в капли, и метагеномное секвенирование отобранных капель с последующим биоинформатическим анализом

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. 13, А), что позволяет оценить чувствительность к Ам_i для каждой конкретной бактерии в конкретном образце микробиоты (рис. 13, Б).

Полученные таким методом данные согласуются с результатами *in vitro* исследования восприимчивости бактерий к амикумацину. 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. 13, Б).

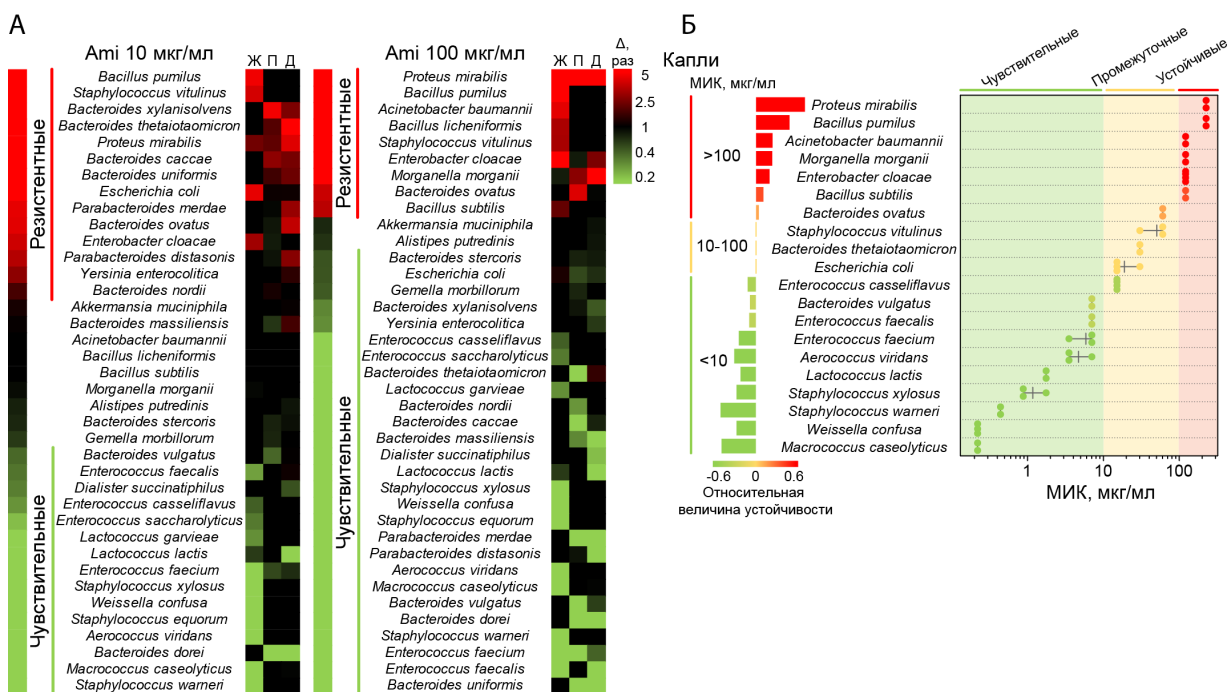
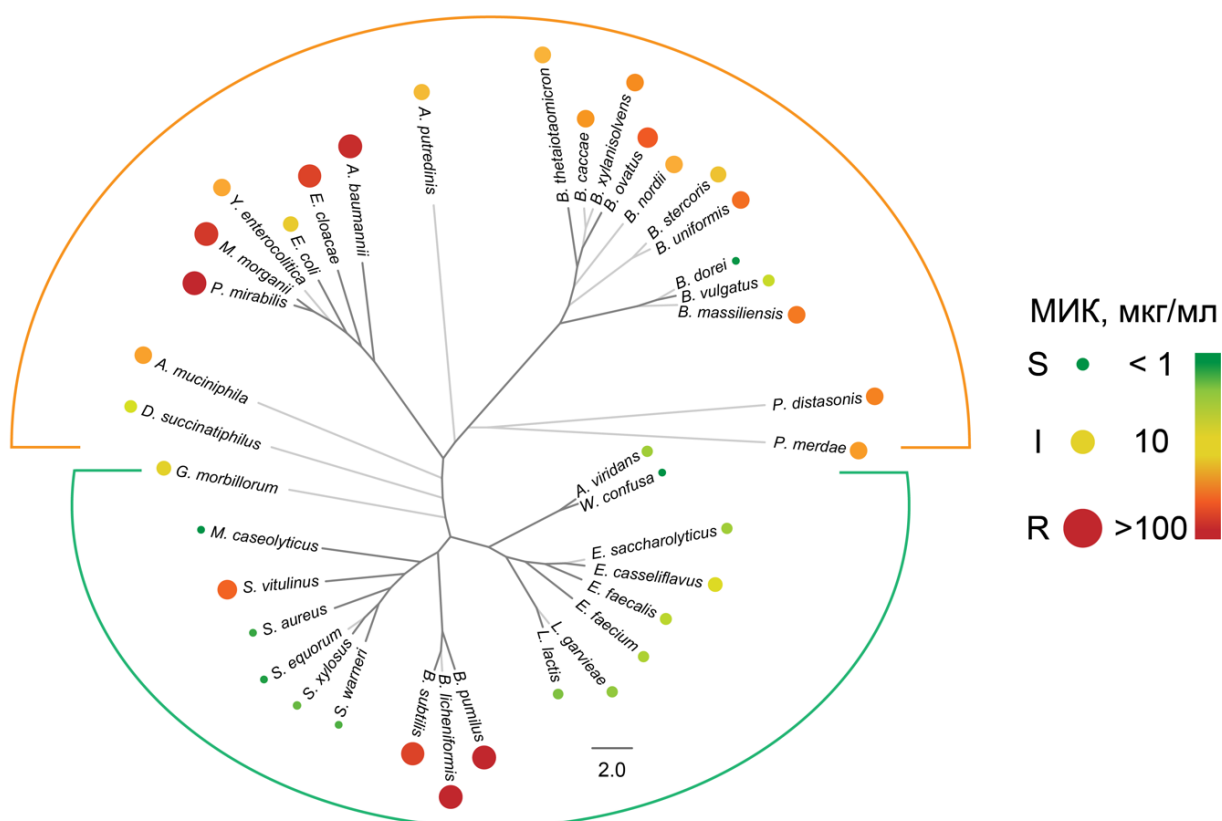


Рисунок 13. А. Тепловая карта, указывающая на изменение частоты встречаемости отдельных бактерий микробиоты после культивации в микрофлюидных каплях в присутствии 10 и 100 мкг/мл амикумаина по сравнению с культивацией без антибиотика. Образцы микробиоты включают микробиоту ротовой полости медведя (Ж), фекальную микробиоту человека больного колитом (П) и фекальную микробиоту здорового донора (Д). Б. Сравнение между значениями 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). Масштабные полосы (слева) показывают относительную величину устойчивости, рассчитанную из изменения частоты встречаемости для каждой бактерии после культивации в каплях в присутствии Ami. Каждая точка диаграммы рассеяния (справа) представляет собой значение МИК, измеренное *in vitro* для конкретного бактериального штамма, горизонтальная полоса указывает на диапазон МИК, а вертикальная полоса показывает среднее значение

В результате нам удалось детализировать спектр активности амикумацина (рис. 14). Было показано, что Ami 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 амикумацин проявляет сниженную эффективность против грамотрицательных бактерий, сохраняя при этом активность в отношении некоторых штаммов, таких как *E. coli*.

Грамотрицательные



Грамположительные

Рисунок 14. Обзор спектра активности Am_i в соответствии с филогенией видов бактерий. Размер и цвет маркеров соответствуют среднему значению МИК для различных штаммов конкретного вида бактерий. Чувствительные (S), умеренно чувствительные (I) и резистентные (R) бактерии отмечены зеленым, желтым и красным цветами соответственно

3.3. Анализ кластера генов биосинтеза амикумацина

Для идентификации механизма биосинтеза амикумацина мы провели полногеномное секвенирование штамма *B. pumilus* 124. Используя биоинформатические методы анализа генома, мы обнаружили, что в состав кластера генов биосинтеза Am_i входят гены синтетаз нерибосомальных пептидов, а также поликетид синтетазы. Помимо этого, мы идентифицировали кластеры генов биосинтеза в составе геномов близкородственных *B. pumilus* 124 бактерий, гомологичные кластеру генов биосинтеза амикумацина (рис. 15).

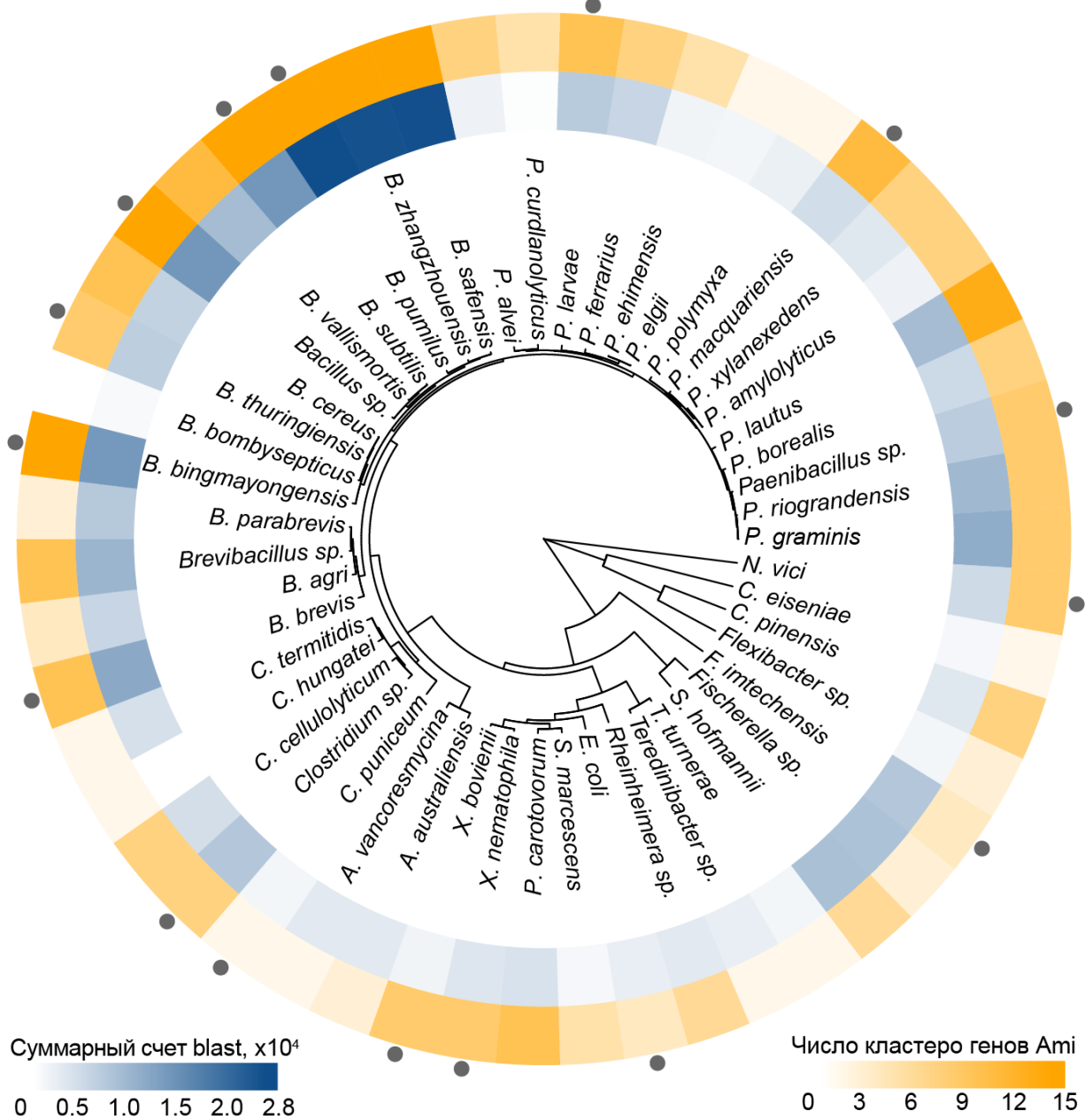


Рисунок 15. Филогенетическое дерево, демонстрирующее гомологию кластера генов биосинтеза Am_i штамма *B. pumilus* 124 и близкородственных бактерий, а также подсчет числа гомологичных генов

Для некоторых таких гомологичных кластеров генов были описаны продукты биосинтеза – антибиотики: цвиттермицин [90], паениламицин [91], ксенокумацин [92] и колибактин [93,94] (рис. 16).

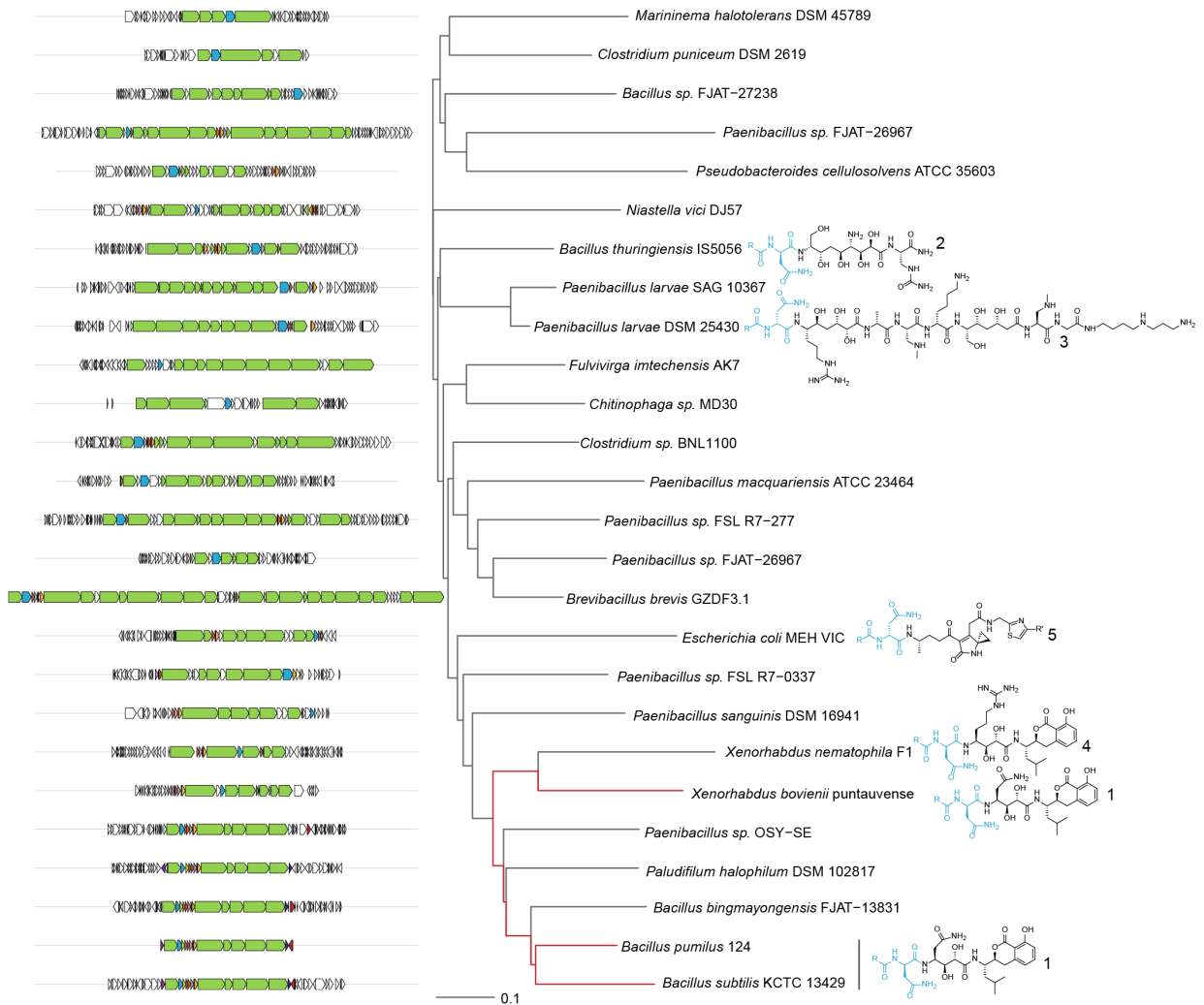


Рисунок 16. Кластеры генов биосинтеза, гомологичные кластеру *Ami*, идентифицированные с помощью биоинформатического анализа генома. Ключевые гены кластеров обозначены зеленым цветом, а пептидазы, активирующие молекулу-предшественник антибиотика синим цветом. Филогенетическое дерево для различных кластеров было построено на основе гомологии *blastp*. 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

Примечательной особенностью этих кластеров является наличие гена, кодирующего специфическую пептидазу, которая активирует молекулу-предшественник антибиотика. Также в составе данных кластеров генов

присутствует дополнительный ген, кодирующий фермент N-ацетилтрансферазу AmiS, которая инактивирует Ami и обеспечивает саморезистентность бактерии *X. bovienii* [95]. Тот факт, что гомологичный *amiS* ген отсутствует в геноме штамма *B. pumilus* 124, означает наличие иного механизма саморезистентности у данной бактерии.

Анализируя архитектуру кластера генов биосинтеза амикумацина, мы обнаружили в непосредственной близости к ключевым генам биосинтеза амикумацина открытые рамки считывания, кодирующие ферменты с неизвестными функциями, которые аннотировались как предполагаемые киназа AmiN и фосфатаза AmiO (рис. 17).

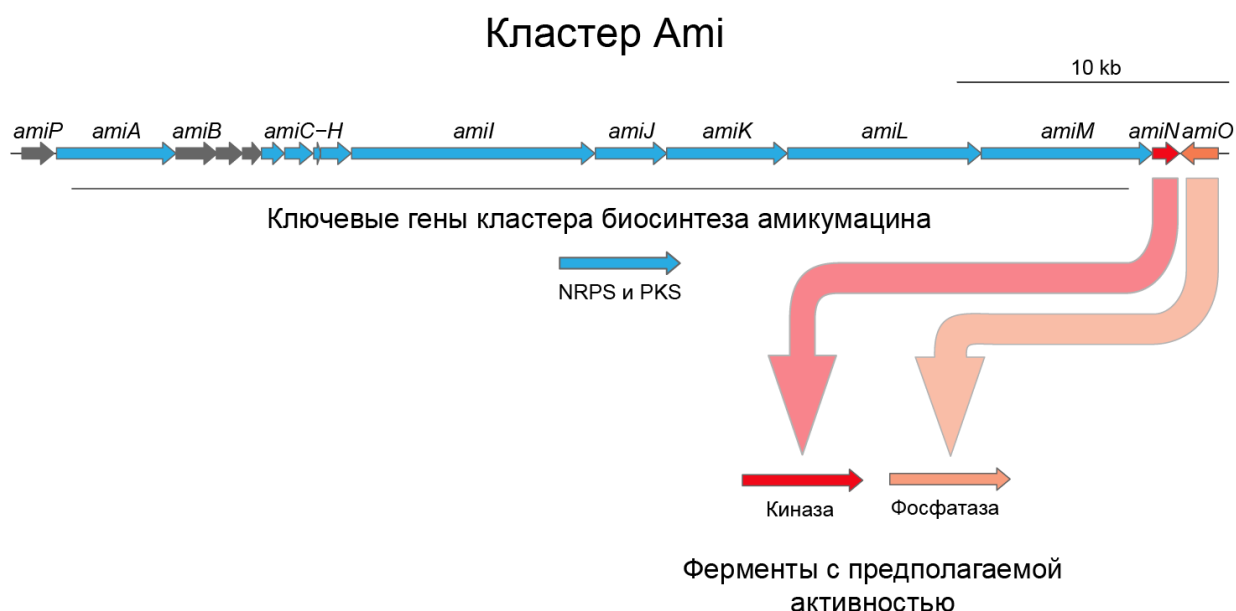


Рисунок 17. Архитектура кластера генов биосинтеза Ami, идентифицированная с помощью полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа геномов. В непосредственной близости к ключевым генам кластера обнаружены ранее не охарактеризованные киназа AmiN и фосфатаза AmiO

Как было сказано ранее, процесс биосинтеза амикумацина штаммом *B. pumilus* 124 является индуцибельным, на уровне продукции антибиотика влияют выбор бактериальной среды, а также аэрация и температура. Для выявления механизма регуляции продукции Ami и подтверждения границ

кластера генов биосинтеза мы провели дифференциальный протеомный анализ штамма *B. pumilus* 124 в состояниях активной и значительно сниженной продукции амикумаина. Нами были установлены границы кластера генов биосинтеза, а также было отмечено увеличение продукции не только описанных ранее ферментов биосинтеза амикумаина, например протеазы AmiB, активирующей молекулу-предшественник антибиотика, но и других не охарактеризованных ранее белков, таких как транспортёр AmiP и фосфатаза AmiO (рис. 18). Таким образом мы предположили, что активация продукции связана с регуляцией фосфорилирования амикумаина в клетках.

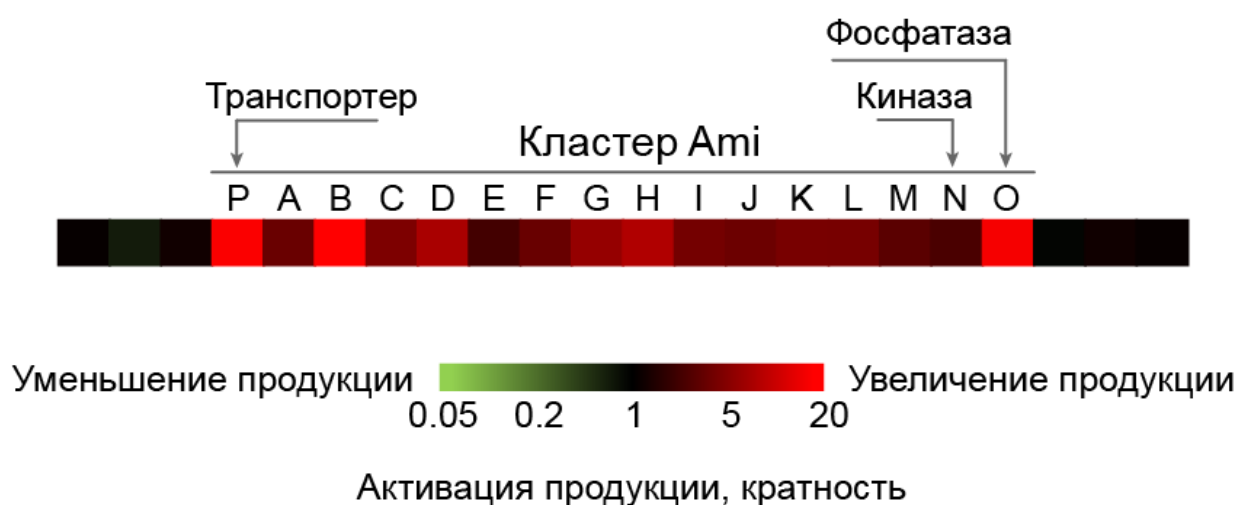


Рисунок 18. Сравнительный протеомный анализ штамма *B. pumilus* 124 в состояниях активной и сниженной продукции Ami. Дифференциальный профиль продукции белков кластера генов биосинтеза, цветовая шкала показывает относительное снижение или увеличение продукции конкретных белков в состоянии активной продукции амикумаина

Метаболомный анализ культуральной среды и клеточных лизатов штамма *B. pumilus* 124 показал присутствие в клеточных лизатах фосфорилированного амикумаина, который не проявлял антибиотической активности по отношению к репортерной патогенной бактерии *S. aureus*, в то время как во внешней среде присутствовало только активное дефосфорилированное производное амикумаина (рис. 19). Данный сравнительный анализ показал, что продукция амикумаина связана с его

фосфорилированием внутри клетки киназой, обеспечивающей саморезистентность, в то время как дефосфорилирование амикумацина фосфатазой, по-видимому, сопряжено с процессом его секреции во внешнюю среду.

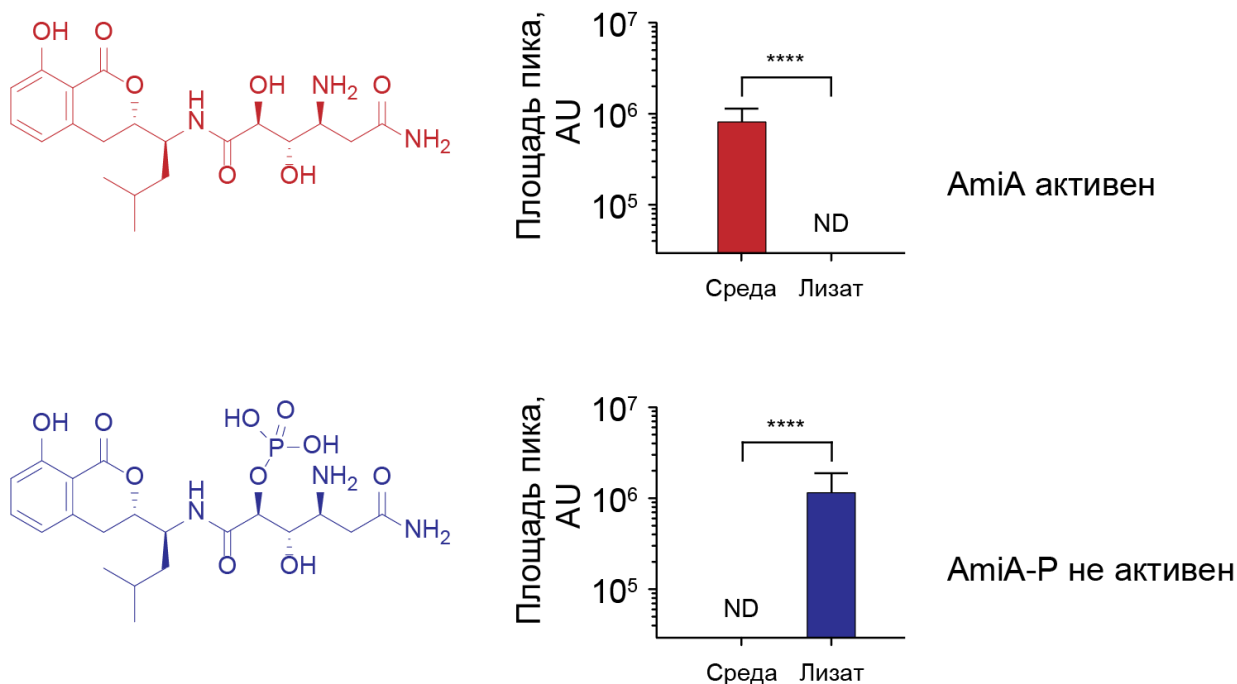


Рисунок 19. Сравнительный метаболомный анализ клеточных лизатов и культуральных сред после культивации штамма *B. pumilus* 124. **** - означает разницу в содержании Ami и его фосфорилированного производного (Ami-P) в среде и клеточном лизате. $P < 0.0001$. Данные представляют среднее значение \pm SD

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. 20). Киназа AmiN приводила к высокоэффективному фосфорилированию амикумацина, в то время как фосфатаза AmiO дефосфорилировала фосфопроизводное амикумацина.

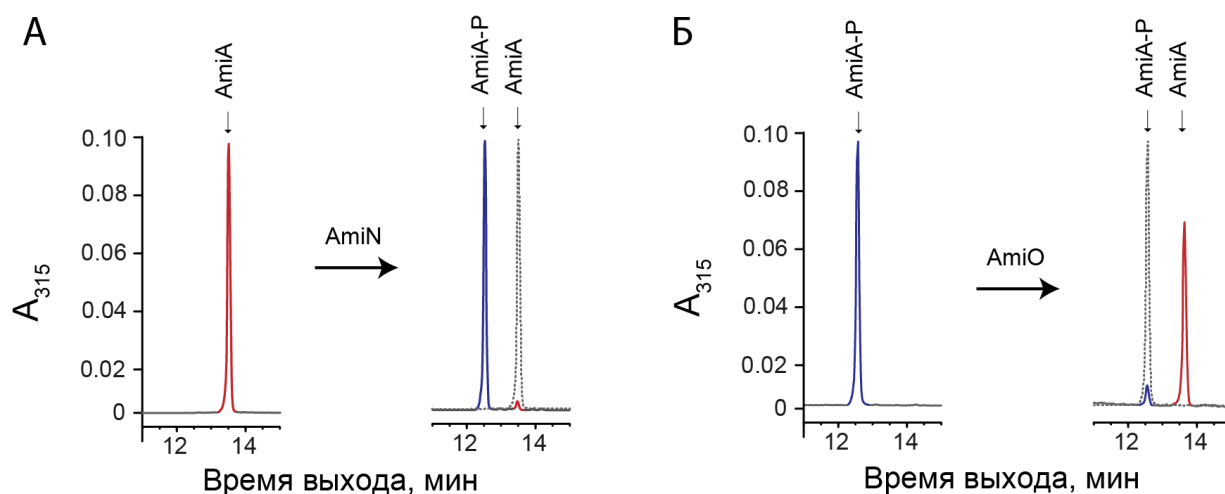


Рисунок 20. Анализ активности ферментов AmiN и AmiO *in vitro*. **А.** Фосфорилирование Ami киназой AmiN. **Б.** Дифосфорилирование фосфорилированного Ami фосфатазой AmiO. Ami отмечен красным цветом. Фосфорилированный Ami (Ami-P) отмечен синим цветом.

Биологическая функция киназы AmiN связана с биосинтезом амикумаина, образуя вместе с фосфатазой AmiO киназно-фосфатазный цикл регуляции продукции Ami и механизм саморезистентности. Однако биоинформатический поиск показал, что существуют многочисленные гомологи киназы AmiN у бактерий рода *Bacilli*, что подчеркивает важное экологическое значение этого фермента.

Биологическая функция киназы AmiN и его гомологов hAmiN и YerI из не продуцирующих амикумаин 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 НЕК293Т (таблица 2).

Таблица 2. Гетерологическая экспрессия киназ AmiN и hAmiN в бактериальных клетках и клетках млекопитающих. * значения представляют IC₅₀ по отношению к Ami. ** штамм *E. coli* BW25113 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой, которая кодирует hAmiN

Гетерологический хозяин	МИК, мкг/мл	
	WT	+ amiN
<i>B. subtilis</i> 168 $\Delta yerI$	0.7±0.1	>100
<i>B. subtilis</i> 168	>100	-
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	15±2	>100
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta tolC$	0.20±0.03	30±3
HEK293T	0.05±0.01*	20±5*
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta tolC$	0.20±0.03	23±2**

Трансформация штамма *E. coli* BW25113 $\Delta tolC$ плазмидой, кодирующей киназу AmiN, обеспечила устойчивость к Ami рекомбинантного штамма (рис. 21). 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. 21), при этом его трансформация плазмидой, кодирующей AmiN, привела к восстановлению резистентности по отношению к Ami. Аналогично культуральные клетки HEK293T, изначально чувствительные к амикумацину, приобрели резистентность после трансфекции плазмидой, кодирующей киназу AmiN.

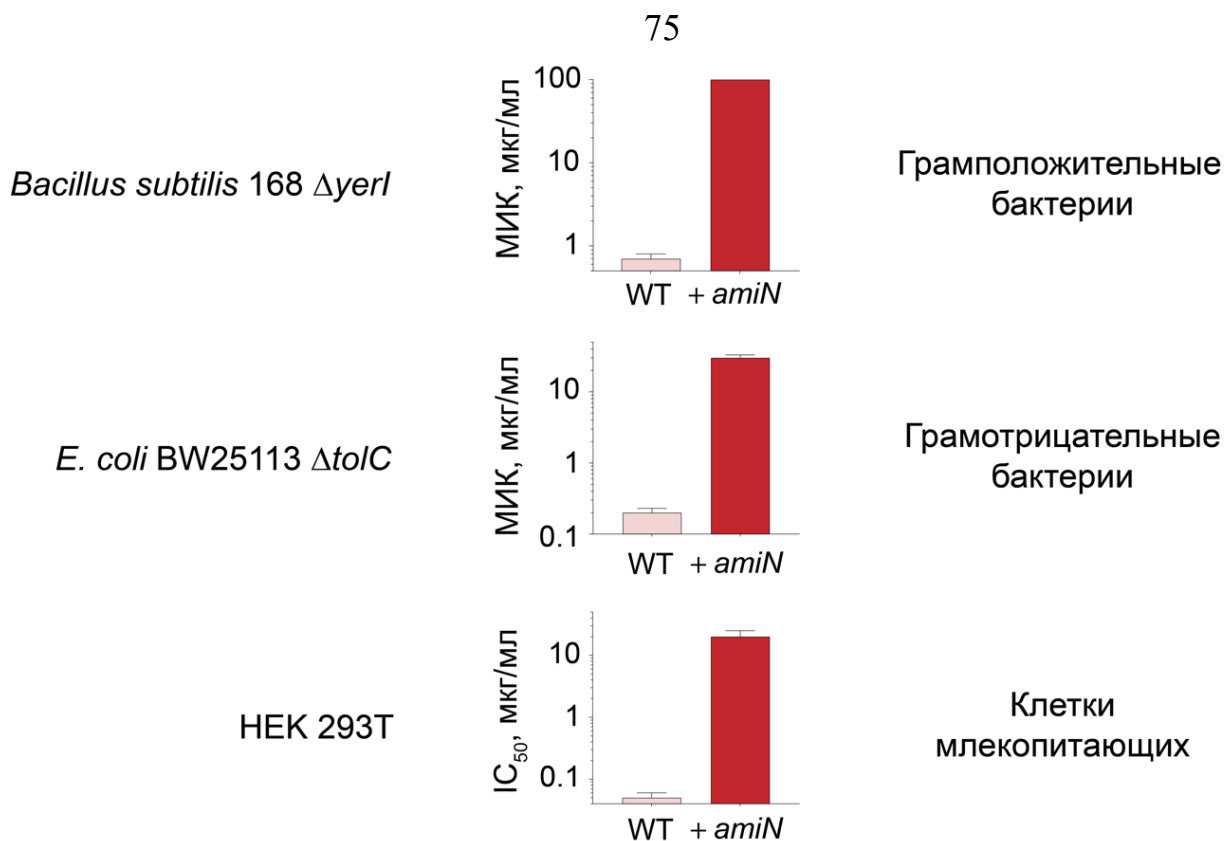


Рисунок 21. Влияние гетерологической экспрессии киназы *AmiN* на резистентность к амикумацину у модельных микроорганизмов. МИК и IC₅₀ измеряли в трех повторностях. Данные представляют собой среднее значение \pm SD

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

3.4. 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. 22).

$$[\text{АТФ} \cdot \text{Mg}^{2+}] \gg [\text{Ами}]$$



$$K_M = 25 \pm 5 \text{ нМ}$$

$$k_{\text{cat}} = 8.5 \pm 0.3 \text{ сек}^{-1}$$

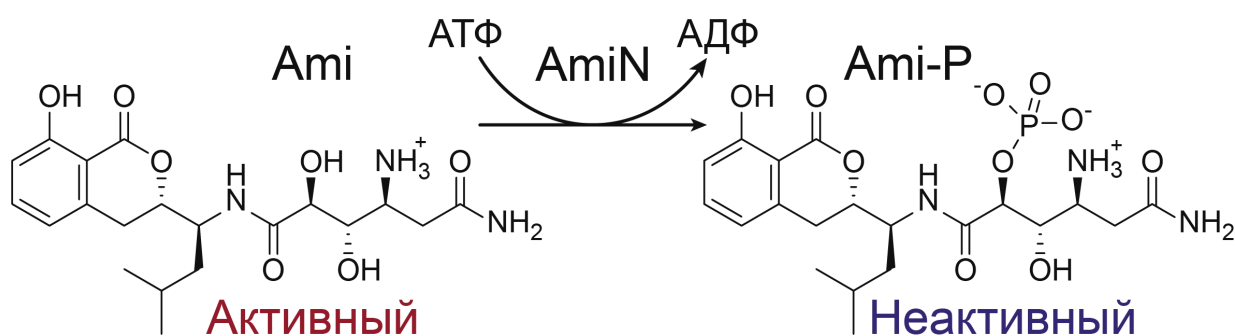


Рисунок 22. Измерение кинетических параметров реакции фосфорилирования Ами киназой АмиN в условиях избытка концентраций АТФ и Mg^{2+} по отношению к субстрату. Измеренные кинетические константы представлены в виде среднего значения \pm SD

Полученные данные свидетельствуют о том, что АмиN имеет близкую к диффузионному пределу каталитическую эффективность $k_{\text{cat}}/K_M = 3.4 \pm 0.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ по отношению к амикумацину, что характеризует АмиN 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. 23).

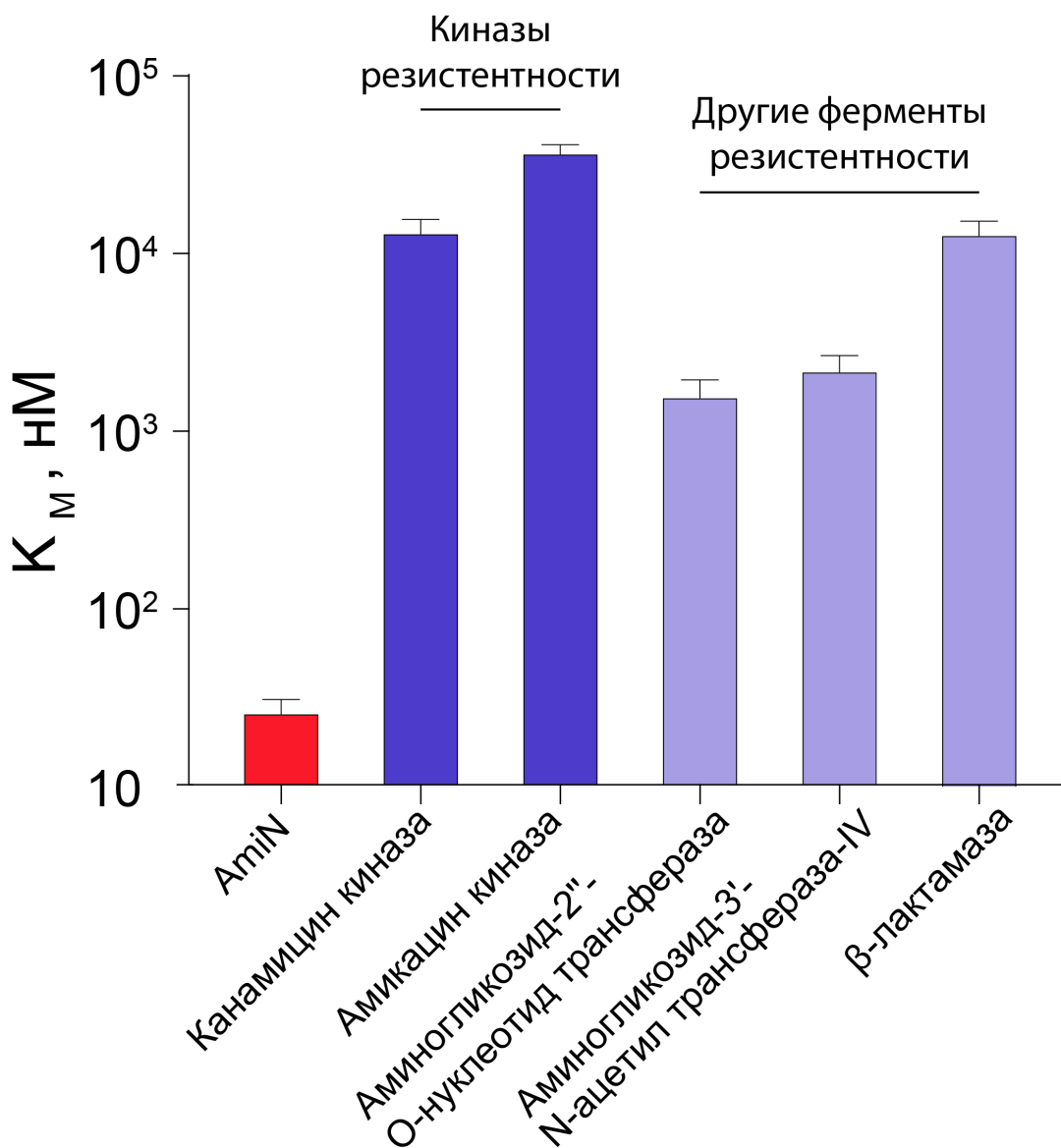


Рисунок 23. Сравнительная диаграмма констант Михаэлиса киназы AmiN и других ферментов резистентности. Константа Михаэлиса для киназы AmiN получена по результатам трех независимых экспериментов. Значения кинетических констант были взяты из литературных источников для канамицин киназы [96], амикацин киназы [97], аминогликозид-2''-О-нуклеотид-трансферазы [98], аминогликозид-3'-N-ацетил-трансферазы [99] и β-лактамазы [100]. Данные представляют среднее значение ± SD

Измеренные нами кинетические константы согласуются с данными о эффективности связывания $K_d = 80 \pm 25$ нМ (таблица 3), полученными методом изотермической титрационной калориметрии (ИТС) для комплекса

амикумацина с AmiN в присутствии негидролизуемого аналога АТФ – аденилимидодифосфата (АМР-РНР).

Таблица 3. Измерение термодинамических параметров связывания АТФ/АДФ/Ами/Ами-Р с AmiN и AmiN-нуклеотидным комплексом с помощью изотермической титрационной калориметрии. ^аВсе измерения проводились в трех повторностях. Данные представляют среднее значение \pm SD. ^б K_d – константа диссоциации, рассчитанная как $1/K_a$. ^в ΔH – изменение энтальпии. ^г $T\Delta S$ – изменение энтропии. ^дND – не определено, K_d превышает значение 0.1 мМ. ^еАми-Р – фосфорилированный Ами

Комплекс	Лиганд	Mg^{2+}			Ca^{2+}		
		$K_d^б$, нМ	$\Delta H^в$, ккал/моль	$T\Delta S^г$, ккал/моль	K_d , нМ	ΔH , ккал/моль	$T\Delta S$, ккал/моль
АмиN-АМРРНР	Ами	80 \pm 25	-18.4 \pm 0.2	-8.7 \pm 0.3	10 \pm 3.1	-17 \pm 0.3	-6.1 \pm 0.4
АмиN-АДФ	Ами	65 \pm 20	-20.1 \pm 0.3	-10.3 \pm 0.4	5.3 \pm 1.7	-26.9 \pm 0.4	-15.6 \pm 0.4
АмиN	Ами	1000 \pm 100	-15.3 \pm 0.2	-7.2 \pm 0.2	1100 \pm 200	-20.5 \pm 0.5	-12.3 \pm 0.5
АмиN	АДФ	4800 \pm 900	-0.7 \pm 0.1	6.5 \pm 0.2	510 \pm 50	-11.8 \pm 0.1	-3.2 \pm 0.1
АмиN	АТФ	ND ^д	-	-	50 \pm 10	-6.8 \pm 0.6	3.1 \pm 0.6
АмиN-АДФ	Ами-Р ^е	ND	-	-	ND	-	-
АмиN-АМРРНР	Ами-Р	ND	-	-	ND	-	-

Мы показали, что AmiN представляет собой новый фермент резистентности, неактивный в отношении известных антибиотиков аминогликозидов, макролидов и тетрациклинов (рис. 24).

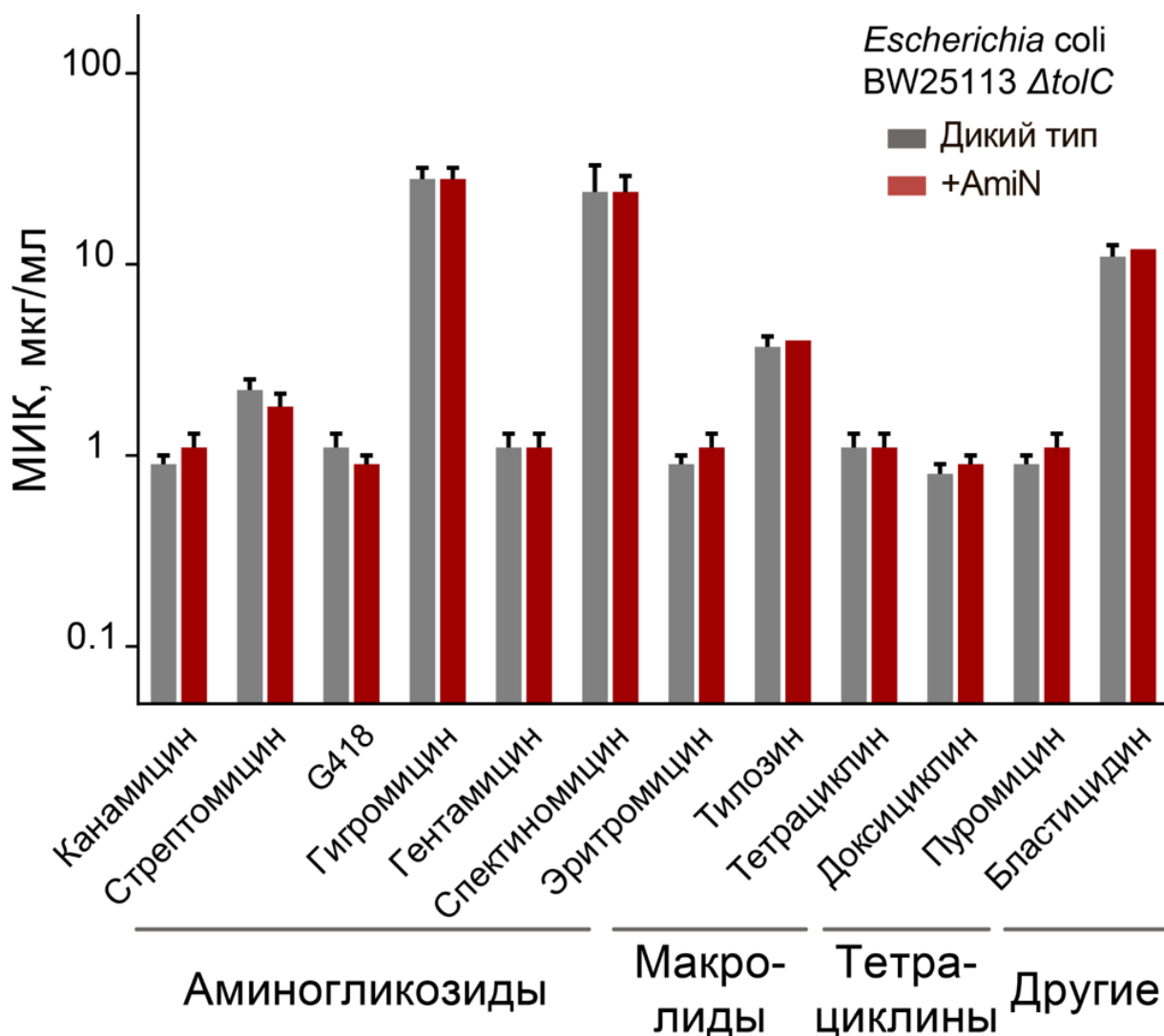


Рисунок 24. Влияние гетерологической экспрессии киназы AmiN на устойчивость к различным антибиотикам. Значения МИК были определены в трех независимых повторностях и проанализированы с помощью t-теста. Различия между штаммом дикого типа и трансформированного плазмидой, которая кодирует AmiN для всех протестированных 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. 25), 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 миеллина (MBP), пептидов YAS-NH₂, YLS-NH₂, YS-NH₂, PSW-NH₂, холина, аминометилпропанола, 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. 25) по сравнению с AmiN.

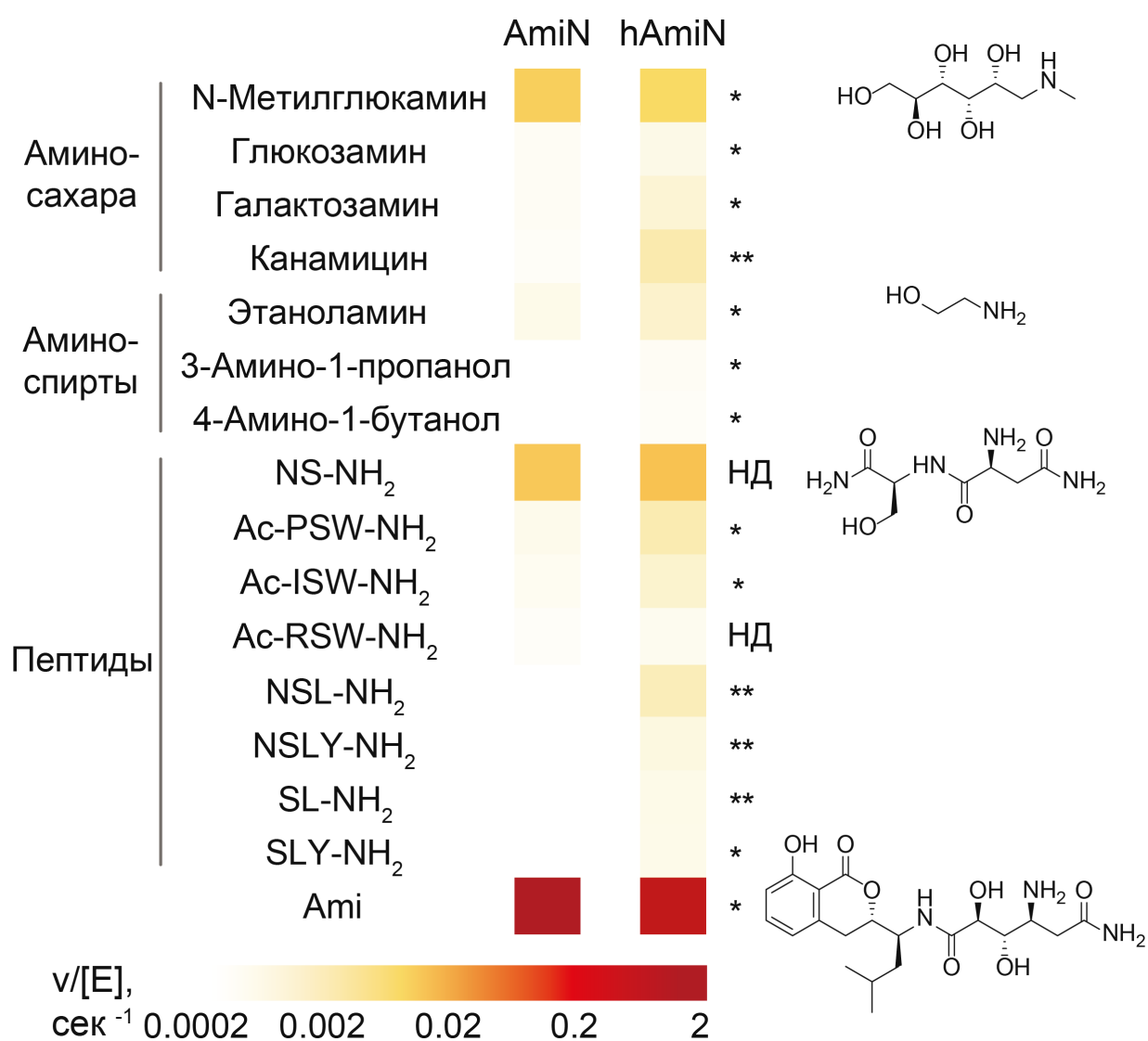


Рисунок 25. Специфичность киназ AmiN и hAmiN по отношению к различным субстратам и амикумацину. Скорости реакций $v/[E]$ определяли в условиях концентраций 10 мМ субстратов, 10 мМ MgCl₂ и 0.1 мМ АТФ.

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

Для более глубокого понимания субстратной специфичности AmiN по отношению к полипептидам мы использовали основной белок миелина (MBP) и комбинаторную пептидную библиотеку в качестве субстратов в реакции фосфорилирования. Детекция даже минимальной киназной активности AmiN обеспечивалась благодаря использованию радиоактивно меченого [γ - 32 P]-АТФ.

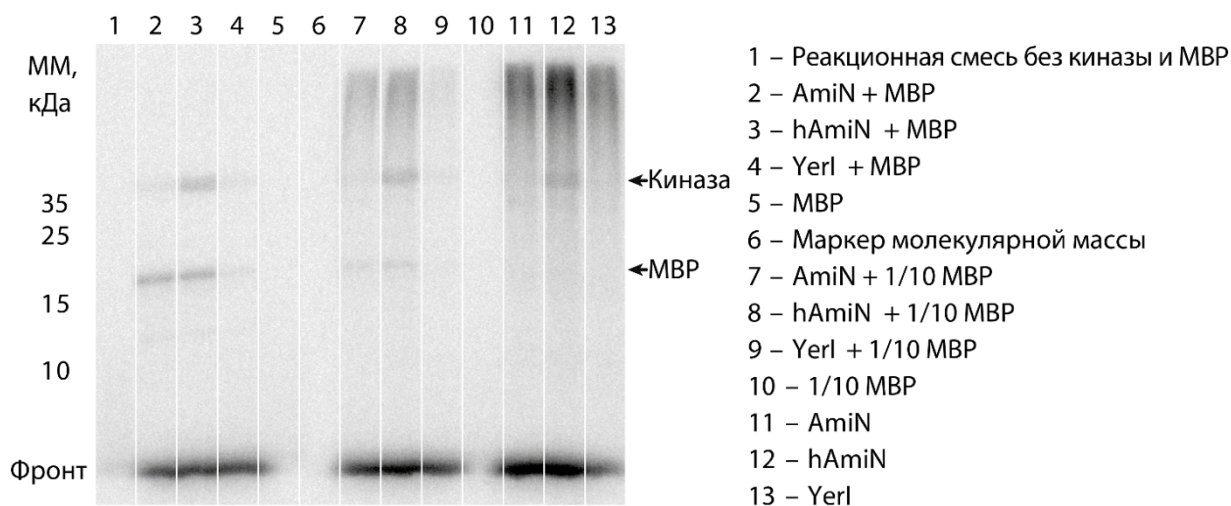


Рисунок 26. Фосфорилирование основного белка миелина (MBP) *in vitro* и автофосфорилирование hAmiN исследовалось с помощью радиоактивно меченого АТФ. Молекулярная масса (ММ) MBP = 18 кДа, AmiN и hAmiN = 39 кДа. Реакции проводили в трех повторностях с использованием 3 мг/мл AmiN и hAmiN и 1 или 0.1 мг/мл MBP, обозначенные как MBP и 1/10 MBP соответственно

Таким образом мы определили, что MBP (рис. 26) и пептиды P/I/R-S-W и Y-A-S, имитирующие химическую структуру Ami, могут быть фосфорилированы киназой AmiN (рис. 27). Однако протеинкиназная

активность Amin была более чем на два порядка ниже по сравнению с активностью по отношению к природному субстрату Ami (рис. 25).

Последовательность пептидной библиотеки:
 $\text{Y-A-x-x-x-x-x-S/T-x-x-x-x-A-G-K-K(биотин)}$
 -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4

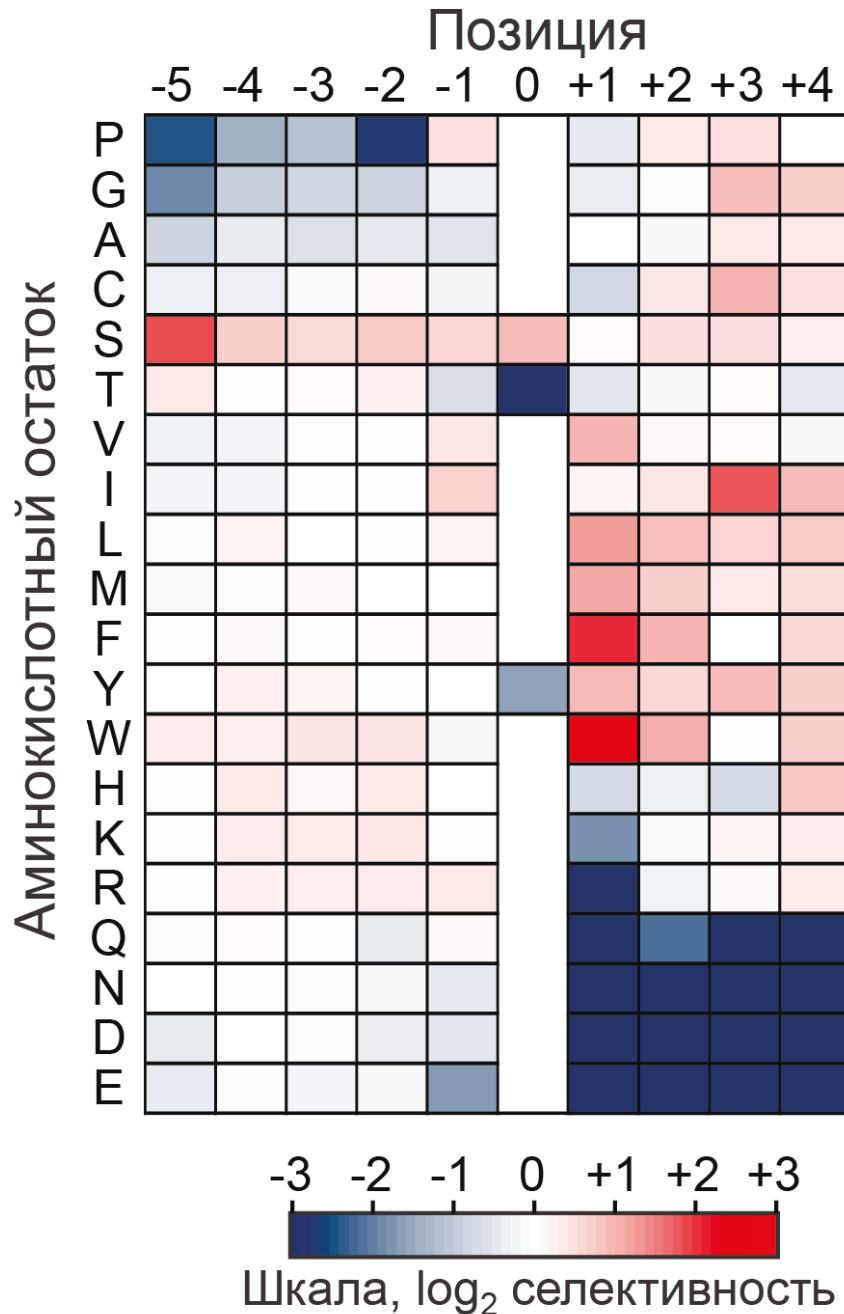


Рисунок 27. Анализ активности Amin по отношению к библиотеке пептидов с использованием радиоактивно меченного АТФ. В тепловая карта показывает относительный уровень фосфорилирования каждого компонента библиотеки из 183 пептидов. Библиотека имеет последовательность,

показанную вверху. Во всех пептидах имеется зафиксированный фосфоакцепторный сайт S/T. 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. Тепловая карта представляет усредненную селективность по отношению к пептидам

Киназа AmiN и ее гомологи демонстрируют исключительные ферментативные характеристики и субстратную специфичность по отношению к природному субстрату амикумацину. 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.

3.5. 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. 28). В то же время в отличие от известных киназ антибиотиков AmiN-подобные киназы более близки малоизученным подсемействам аминопропанолкиназ и предполагаемых Ser/Thr киназ с неизвестной ферментативной активностью.

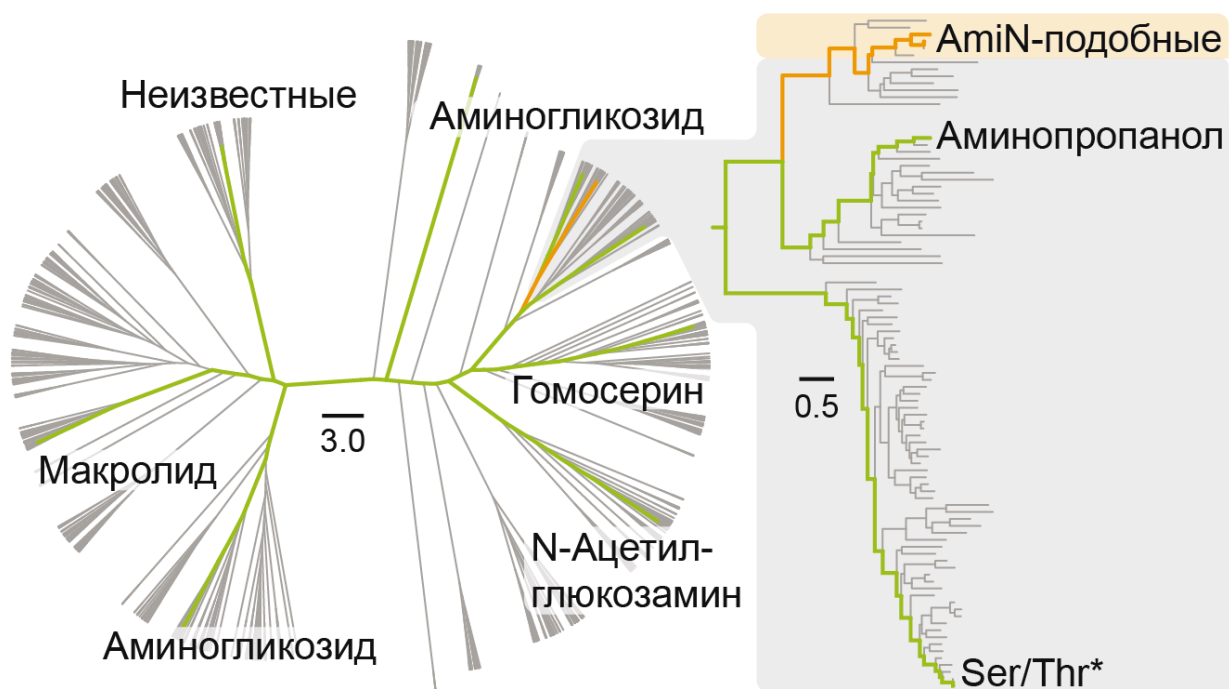


Рисунок 28. Филогенетическое дерево AmiN-подобных киназ из суперсемейства аминогликозид фосфотрансфераз APH. Известные структуры ранее изученных киназ и киназ AmiN/hAmiN показаны зелеными и оранжевыми линиями соответственно

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. 29).

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. 29).

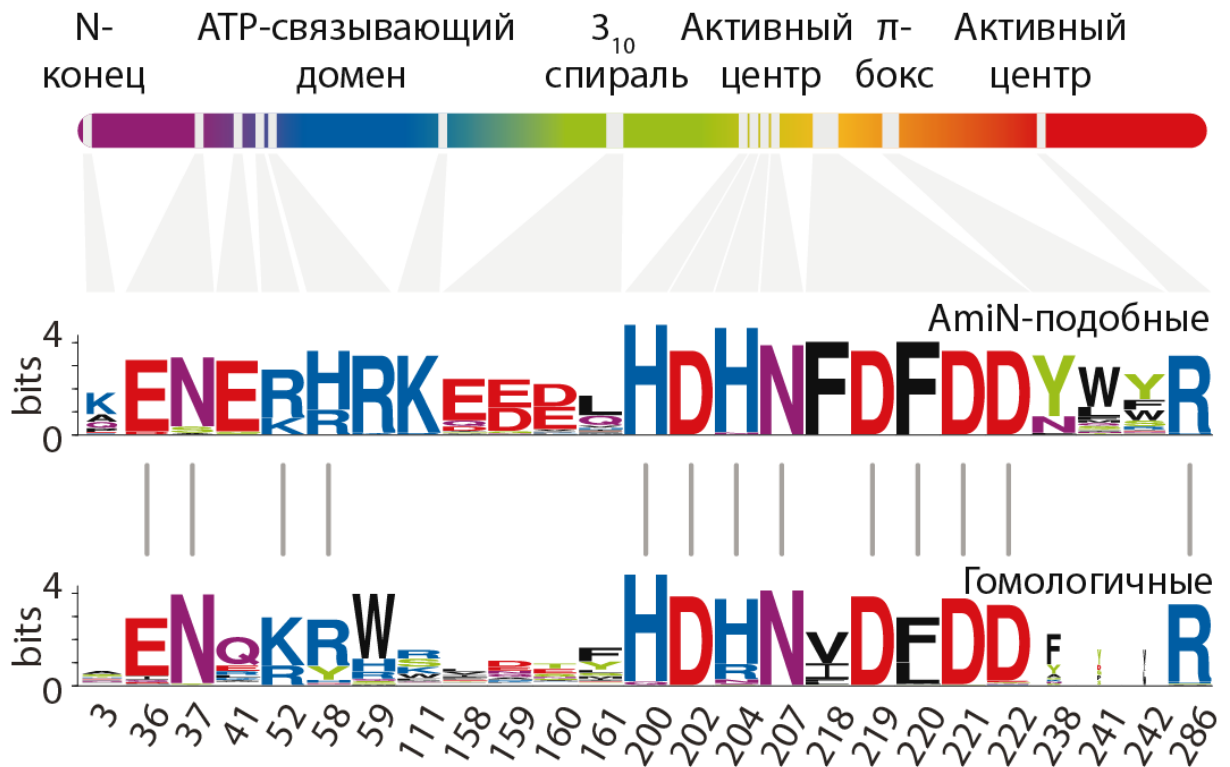


Рисунок 29. Логотип последовательности, иллюстрирующий консервативные аминокислотные остатки семейств АмиN-подобных, AP и Ser/Thr* подсемейств киназ (отмечены серыми линиями)

Гомологи АмиN были обнаружены среди многих видов бактерий рода *Bacilli*, что подчеркивает функциональную значимость данных ферментов (рис. 28). Более того, мы обнаружили гомолог АмиN и гомологичный кластер биосинтеза амикумацина у термоактиномицета *Paludifilum halophilum* (рис. 30).

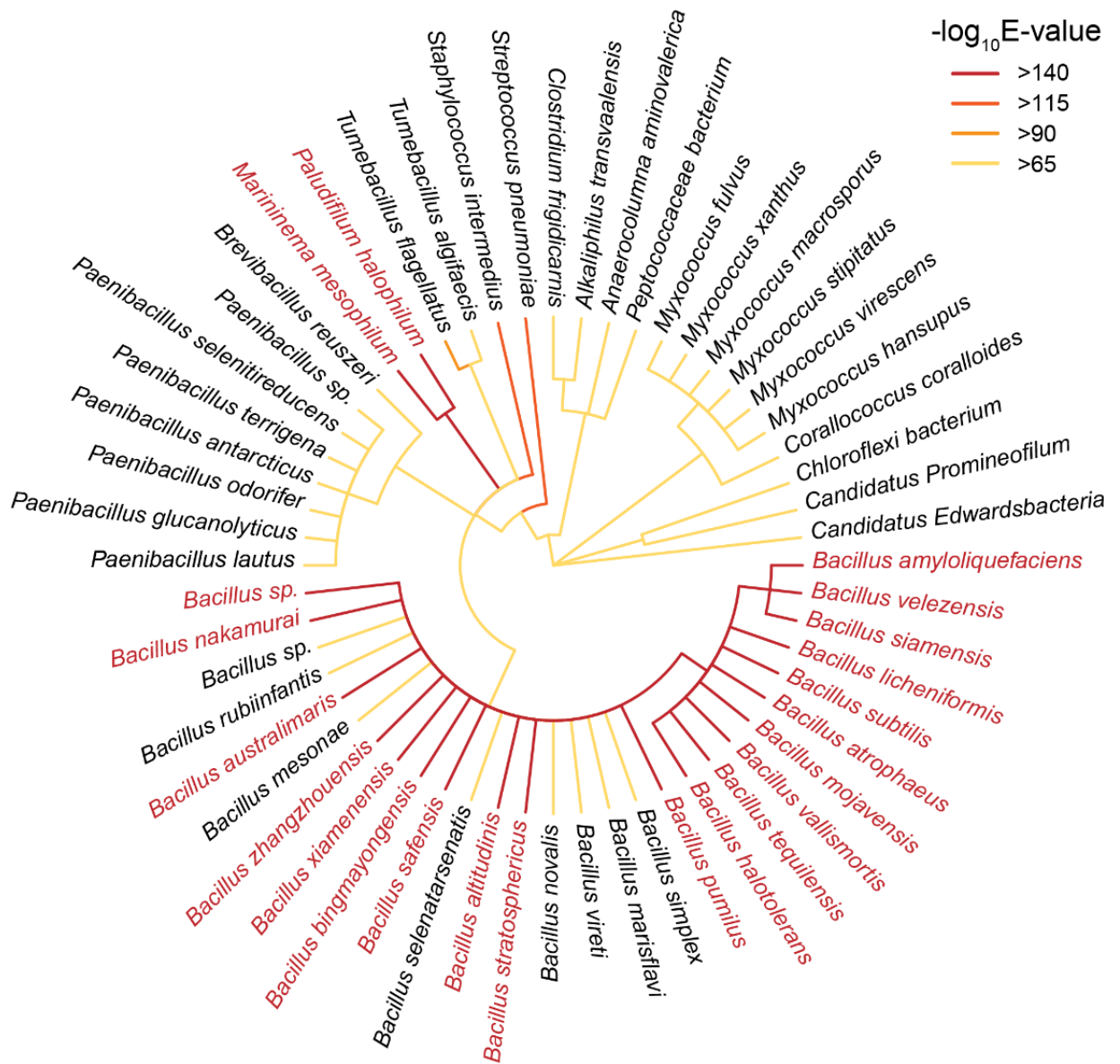


Рисунок 30. Филогенетическое дерево бактерий, несущих в своем геноме гены киназ, гомологичные AmiN штамма *B. pumilus* 124. Цвет представляет собой значение E-value выравнивания blastp

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.

3.6. 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. 31 и 32).

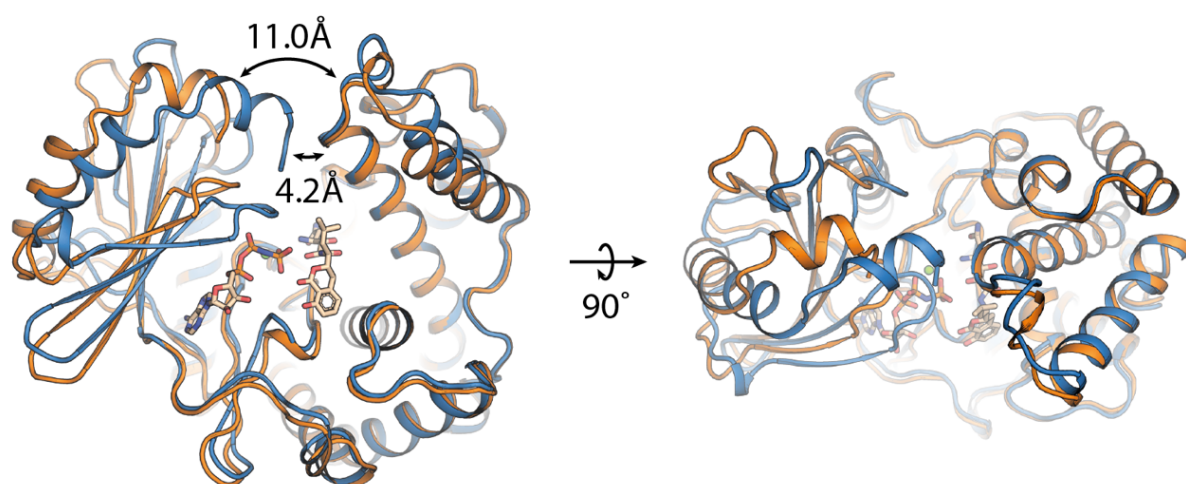


Рисунок 31. Общий вид открытого и закрытого состояний AmiN, опосредованное связыванием Ami. Представлены структуры AmiN без лигандов (оранжевый) и AmiN (синий) в комплексе с ионом Mg^{2+} , AMP-PNP и Ami. Расстояния измерены между $C\alpha$ атомами остатков H2 и A297. Процесс закрытия обусловлен движением доменов в нескольких плоскостях

При этом закрытие фермента обеспечивает возможность протекания реакции переноса фосфата благодаря пространственному сближению остатка гамма-фосфата АТФ и гидроксильной группы амикумацина (рис. 32, Б).

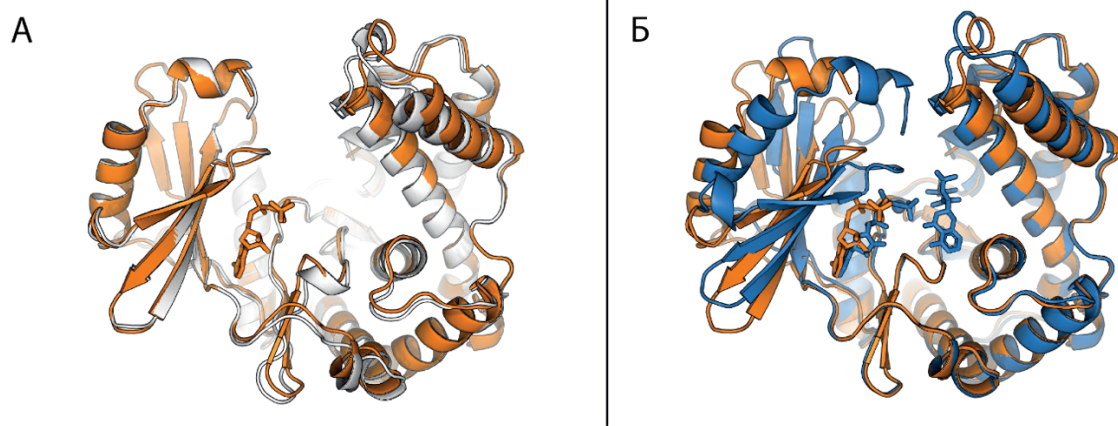


Рисунок 32. Связывание АТФ не приводит к образованию закрытой формы AmiN. **А.** Наложение кристаллической структуры AmiN без лигандов (серый) и AmiN в комплексе с АТФ (оранжевый). **Б.** Наложение кристаллической структуры AmiN в комплексе с АТФ (оранжевый) и AmiN в комплексе с Mg^{2+} , AMP-PNP и Ami (синий)

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 металла (рис. 33, А). 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 амикумацина (рис. 33, Б).

Закрытая форма AmiN стабилизируется сетью внутримолекулярных взаимодействий между аминокислотными остатками N-концевого АТФ-связывающего домена, субстрат-связывающего домена и гидрофильными функциональными группами амикумацина (рис. 33, А, В и Г). 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. 33, Д).

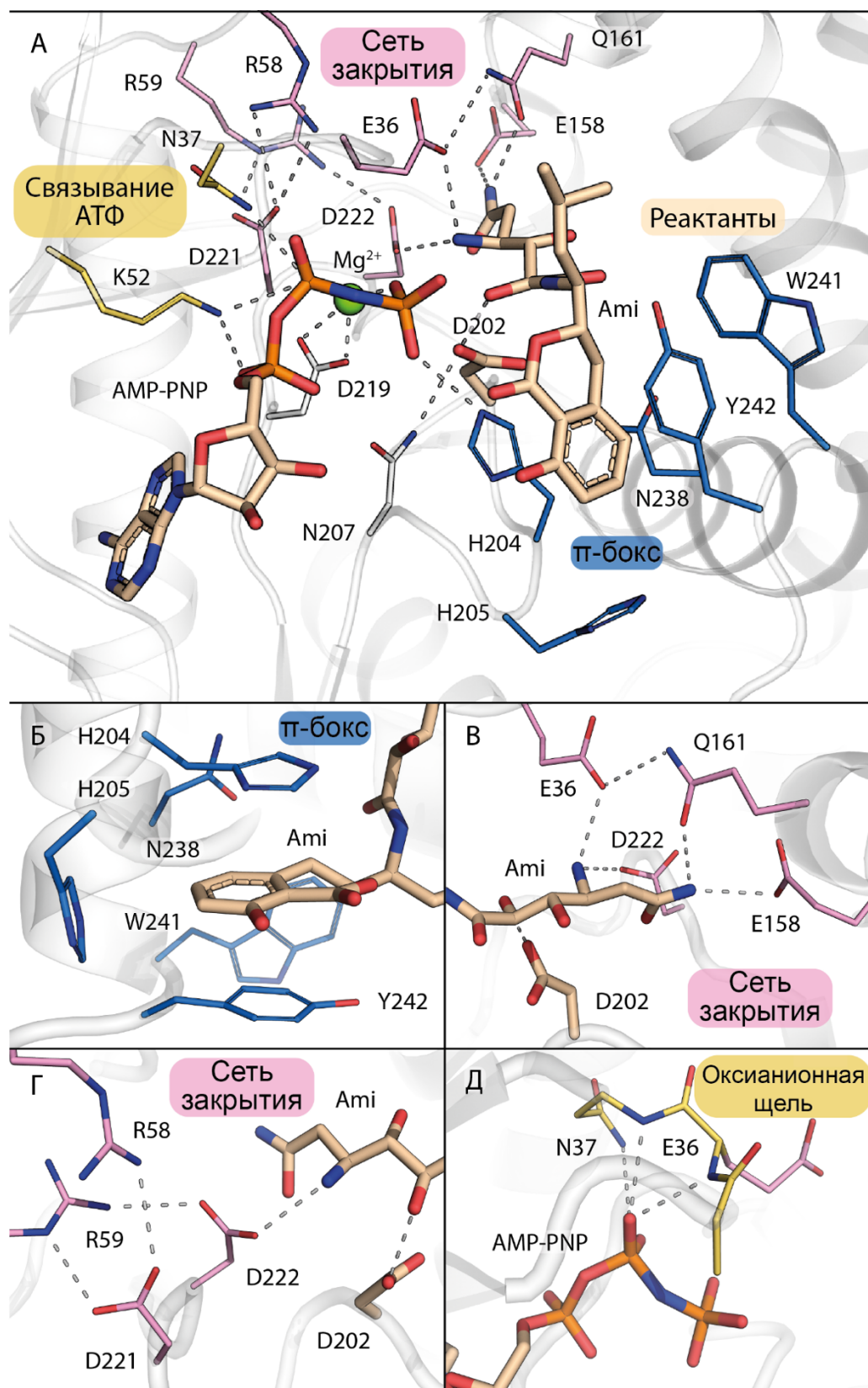


Рисунок 33. Структурная организация активного центра киназы AmiN. **А.** Общий вид активного центра AmiN. **Б.** π-бокс, отвечающий за связывание с

высоким сродством Ami , включает в себя аминокислотные остатки H204, H205, N238, W241 и Y242. **В**, **Г**. Внутримолекулярная сеть взаимодействий между N-концевым АТФ-связывающим доменом и субстрат-связывающим доменом образована за счет водородных связей и электростатических взаимодействий между **В**. $\text{NH}^{3+}_{\text{Ami}}\text{-E36-Q161-CONH}_{2\text{Ami}}$ и **Г**. $\text{Ami-D222-D221-R58-R59}$, благодаря чему обеспечивается стабилизация закрытого состояния AmiN . **Д**. Образование оксианионной щели, играющей активную роль в процессе переноса фосфата, происходит в результате образования закрытой формы AmiN . Пунктирными линиями обозначены водородные связи и электростатические взаимодействия

Для валидации предполагаемых функций аминокислотных остатков, необходимых для обеспечения катализа, был проведен аланиновый скрининг активного центра AmiN .

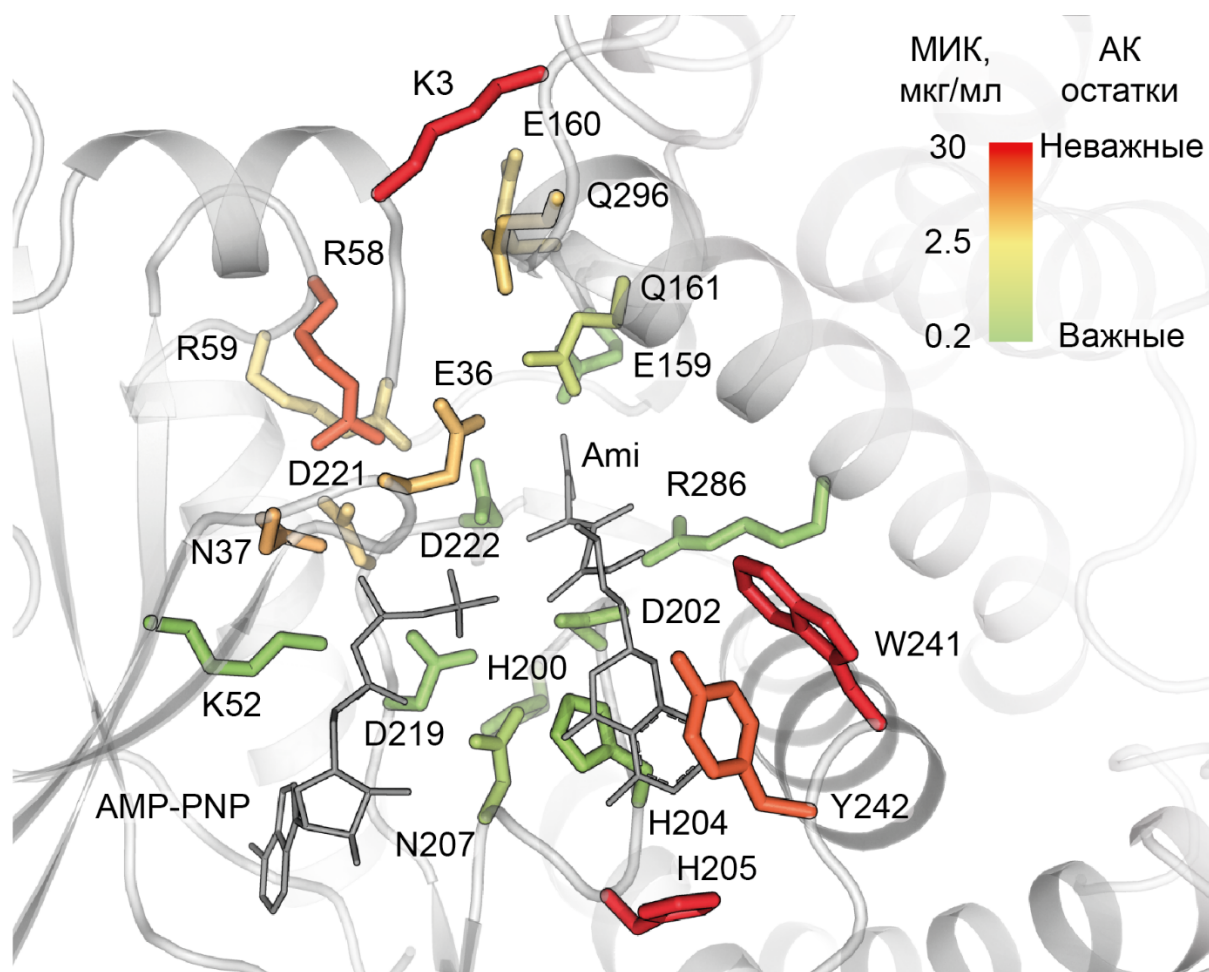


Рисунок 34. Аминокислотные остатки, необходимые для обеспечения

каталитической активности AmiN . Цвет указывает на устойчивость к амикумацину штаммов *E. coli* BW25113 ΔtolC , продуцирующих Ala-замещенные мутанты AmiN , определенную как минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) рекомбинантных штаммов

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. 34).

3.7. Исследование механизмов каталитической активности киназ амикумацина

Мы исследовали зависимость скорости реакции фосфорилирования Ami от концентрации Mg^{2+} (рис. 35, 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. 35, 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 $[\text{АТФ}\cdot\text{Mg}^{2+}]$, достигая максимума в условиях, когда все молекулы АТФ находятся в комплексе $[\text{АТФ}\cdot\text{Mg}^{2+}]$ (рис. 35, Б).

Таким образом, на основании кинетических и структурных данных мы пришли к выводу, что для функционирования AmiN нужен только один ион Mg^{2+} , в отличие от протеинкиназ, которым требуется два иона Mg^{2+} для обеспечения функциональной активности [101]. В отличие от таких

протеинкиназ, AmiN необходим один ион Mg^{2+} для обеспечения максимальной ферментативной активности, тем самым подтверждая, что в качестве субстрата для AmiN выступает комплекс $[ATP \cdot Mg^{2+}]$ (рис. 35).

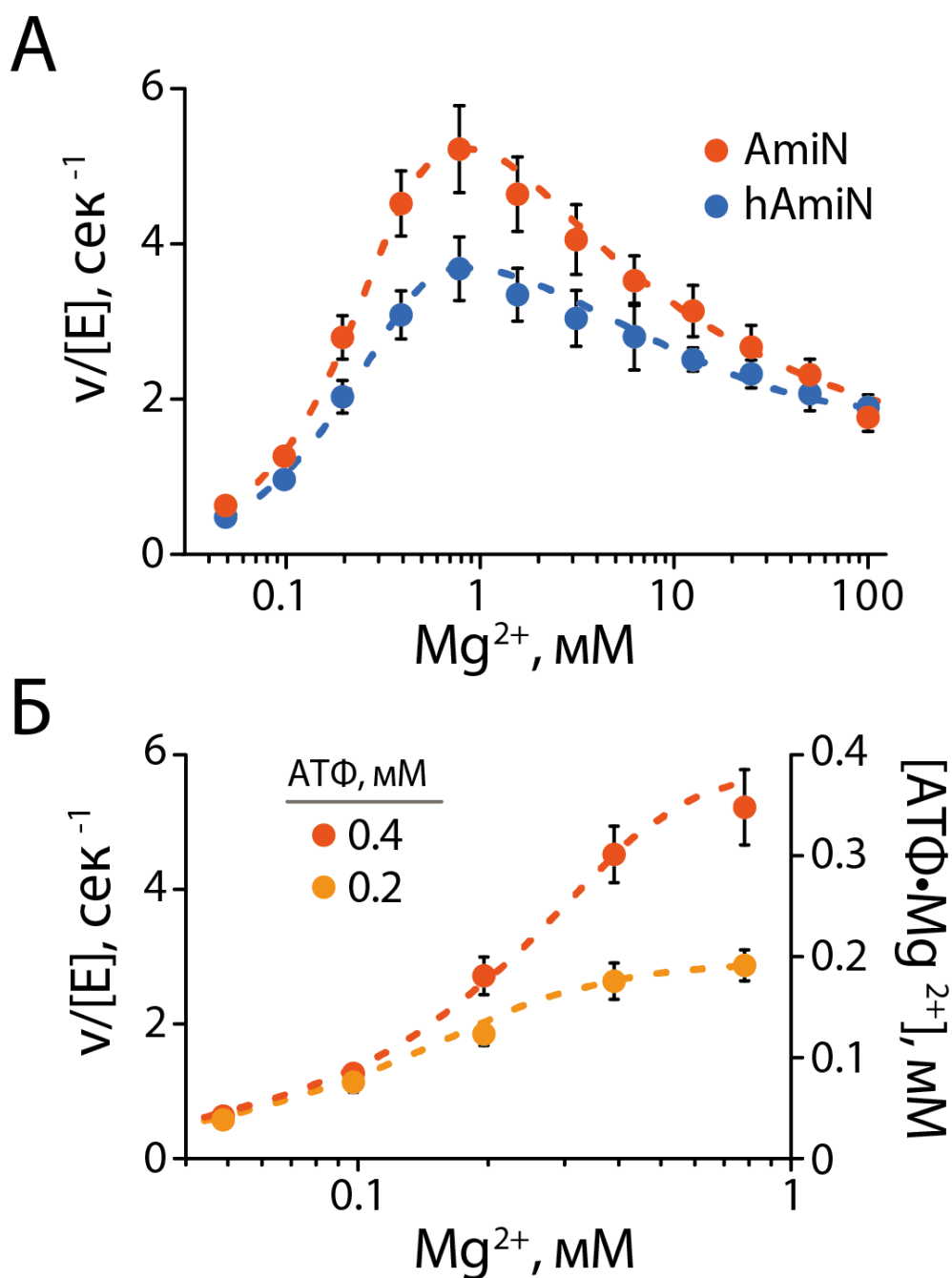


Рисунок 35. Данные исследования металл-зависимости AmiN-подобных киназ. **А.** Зависимость скорости реакции $v/[E]$ от концентрации Mg^{2+} показывает, что при увеличении концентрации ионов металлов выше физиологического уровня ~ 1 mM приводит к ингибированию реакции. Измерение скорости реакции определяли с использованием 0.4 mM АТФ в

трех независимых повторностях. Данные представляют среднее значение \pm SD. Б. Скорость реакции $v/[E]$ фосфорилирования A_{mi} зависит от концентрации комплекса $[ATP \cdot Mg^{2+}]$, рассчитанная с использованием константы диссоциации данного комплекса $K_d = 28.6$ мкМ по данным [102]. Скорости реакций $v/[E]$ определяли с использованием 0.2 и 0.4 мМ АТФ в трех независимых повторностях. Данные представляют среднее значение \pm SD

Кроме того, избыток концентрации АТФ, способного связывать в комплекс ионы Mg^{2+} , не приводил к ингибированию реакции (рис. 36). Совокупность полученных данных позволяет нам с уверенностью заявлять, что киназам A_{miN} и hA_{miN} для обеспечения катализа необходим только один ион Mg^{2+} .

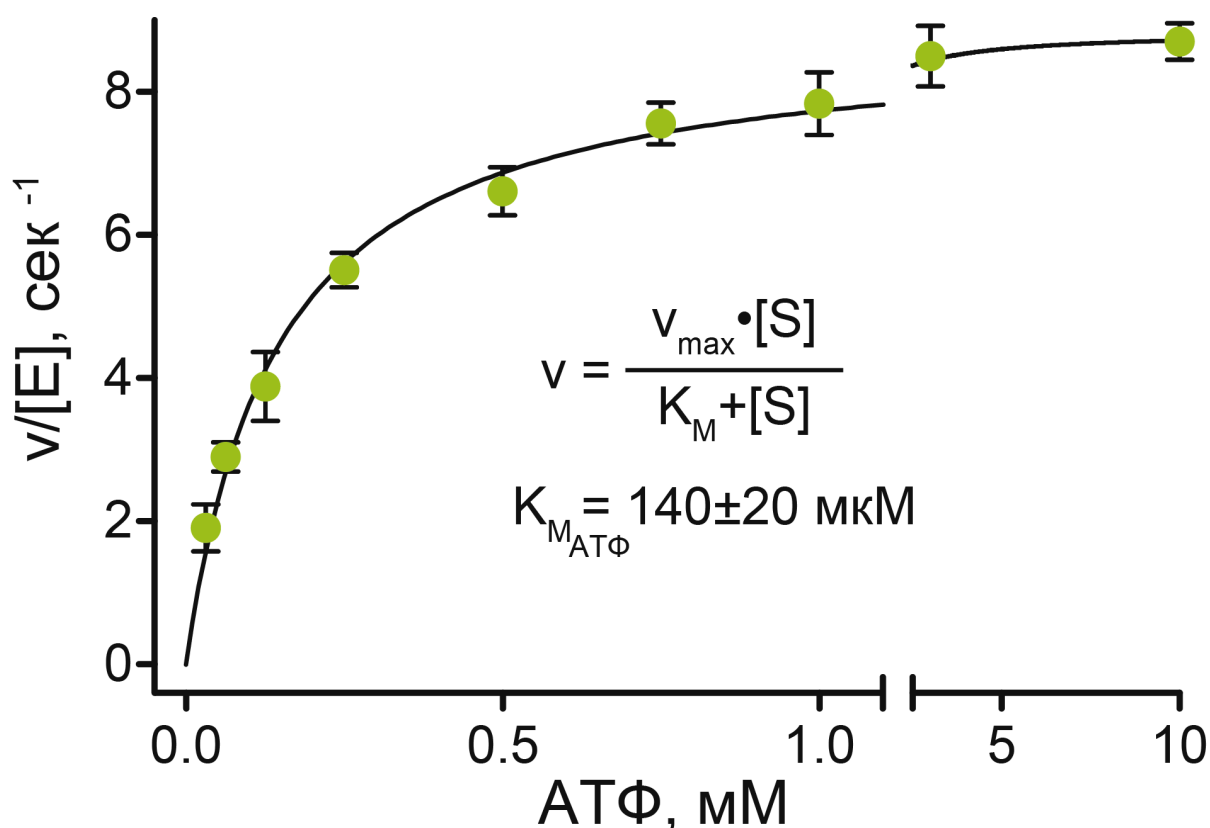


Рисунок 36. Зависимость скорости реакции $v/[E]$ фосфорилирования A_{mi} от концентрации АТФ показывает, что избыток АТФ, который способен связывать свободные ионы Mg^{2+} , не приводит к ингибированию реакции

Анализ активности киназы AmiN в присутствии различных двувалентных 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. 37).

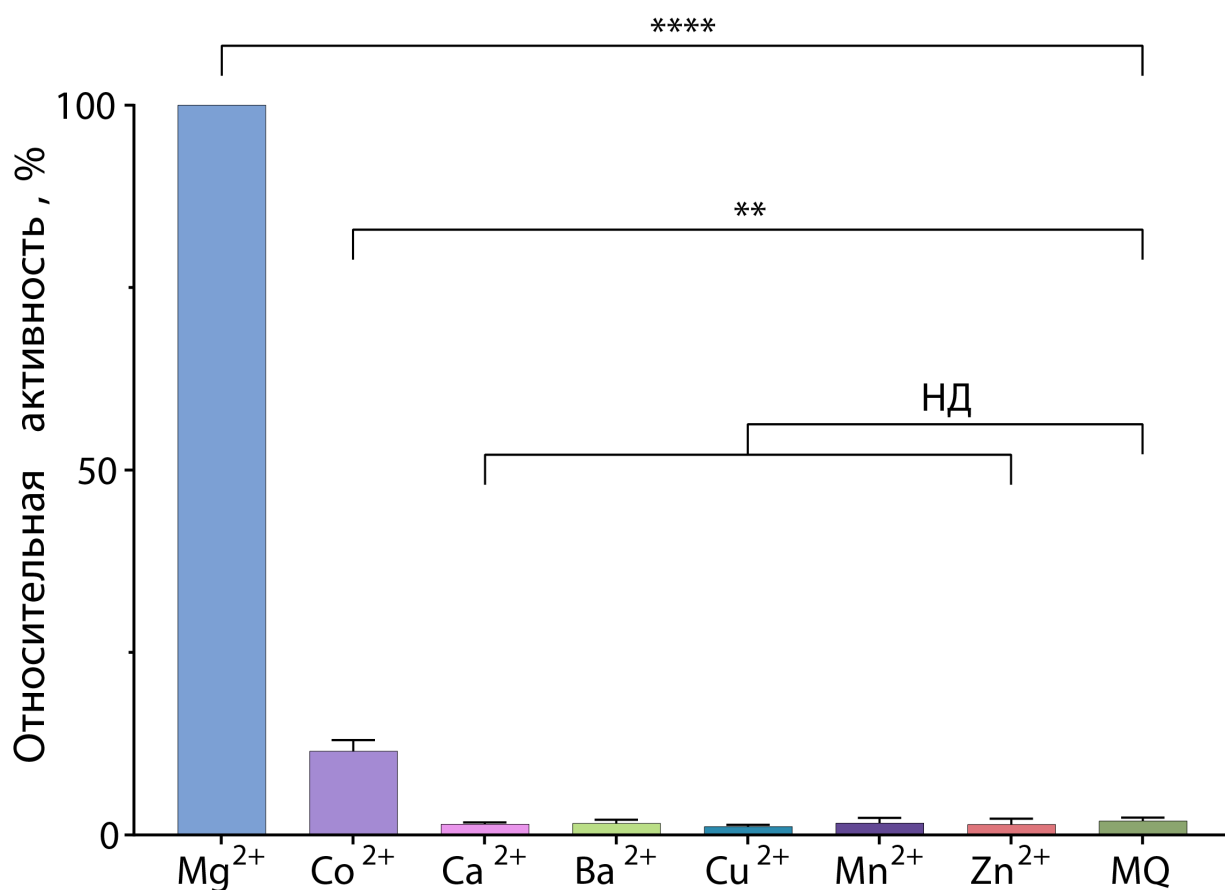


Рисунок 37. Активность AmiN с различными ионами Me^{2+} в качестве кофакторов. Условия реакции: 10 мМ Me^{2+} , 10 мМ АТФ, 1 мкМ Ami и 0.1 нМ AmiN. Относительная активность была определена как отношение скоростей реакции в сравнении со скоростью в присутствии Mg^{2+} в трех повторностях и проанализирована с помощью t-критерия. Фосфорилирование Ami наблюдалось в присутствии ионов Mg^{2+} и Co^{2+} . Данные представляют собой среднее значение \pm SD. **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, НД – нет достоверных отличий в ферментативной активности в сравнении с реакцией без ионов металлов (MQ)

Для прояснения механизмов функционирования киназы AmiN мы построили модели разных этапов реакции фосфорилирования амикумацина, используя биохимические данные активности AmiN , а также данные рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза активного центра AmiN . Для этого мы в сотрудничестве с группой Головина А.В. Отдела математических методов в биологии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ провели молекулярное моделирование динамики активного центра AmiN и реакции фосфорилирования Ami .

Молекулярное моделирование подтвердило данные рентгеноструктурного анализа, свидетельствующие об образовании закрытой формы фермента только после связывания AmiN с амикумацином вместе с АТФ (рис. 31, 32 и состояние $\text{E}\cdot\text{S}$ рис. 38), после чего формируется ранее упомянутая сеть закрытия (рис. 33, А, В и Г). Фосфорилирование Ami приводит к изменению конформации AmiN , стимулируя образование открытой формы фермента и выход продукта реакции (состояние $\text{E}^*\cdot\text{P}$, рис. 38).

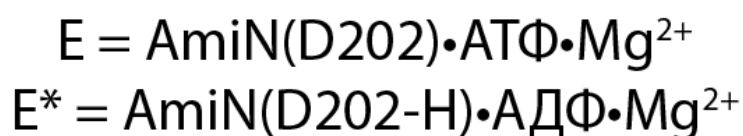
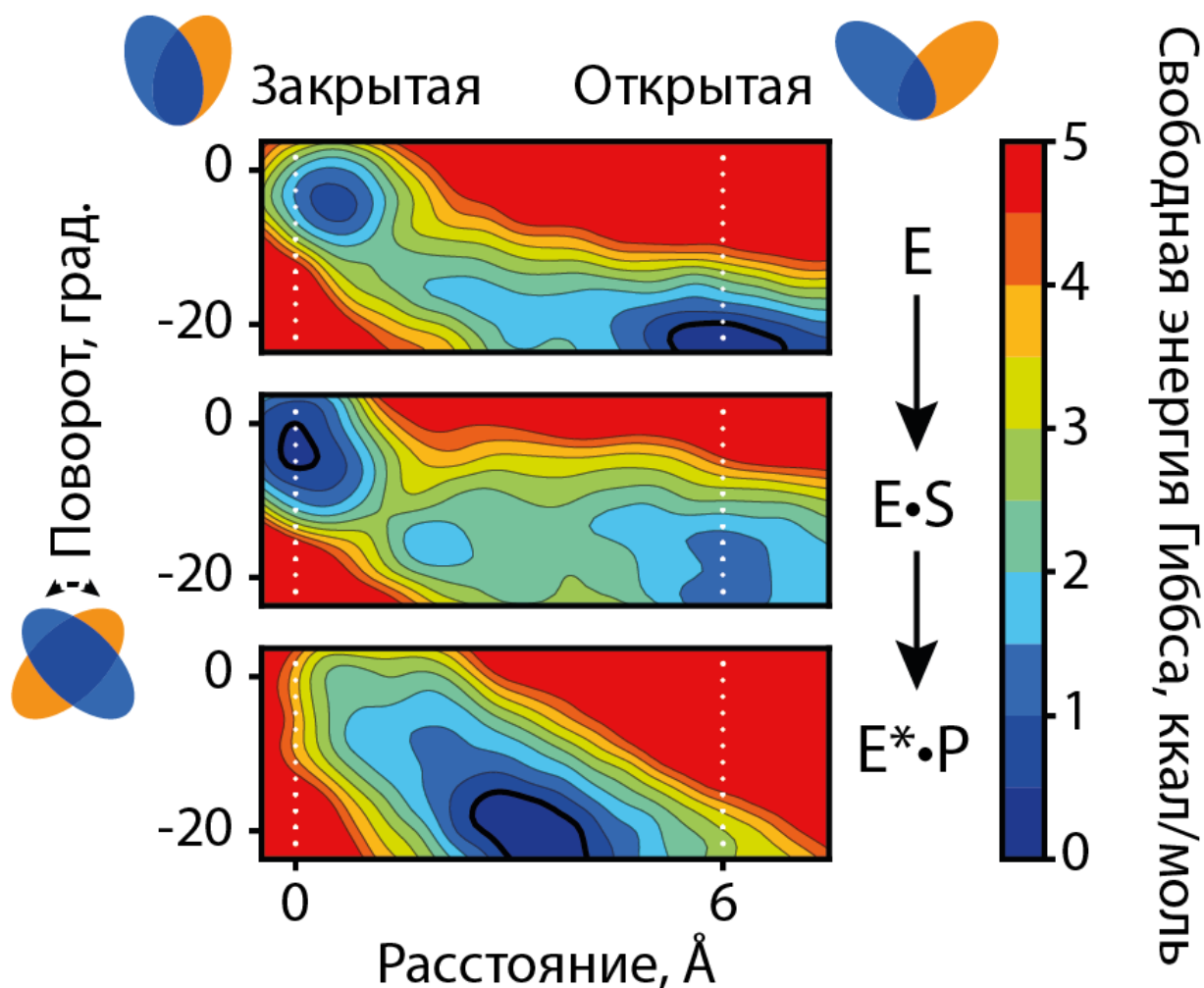


Рисунок 38. График свободной энергии Гиббса указывает на то, что образование закрытой формы AmiN индуцируется связыванием с Ami (E•S), а открытие индуцируется продуктами реакции (E*•P)

Молекулярное моделирование с использованием молекулярной динамики указывает на то, что реакция фосфорилирования амикумадина киназой AmiN протекает по диссоциативному механизму (рис. 39, от Б до Д), а образование закрытой конформации фермента необходимо для осуществления переноса метафосфат-аниона.

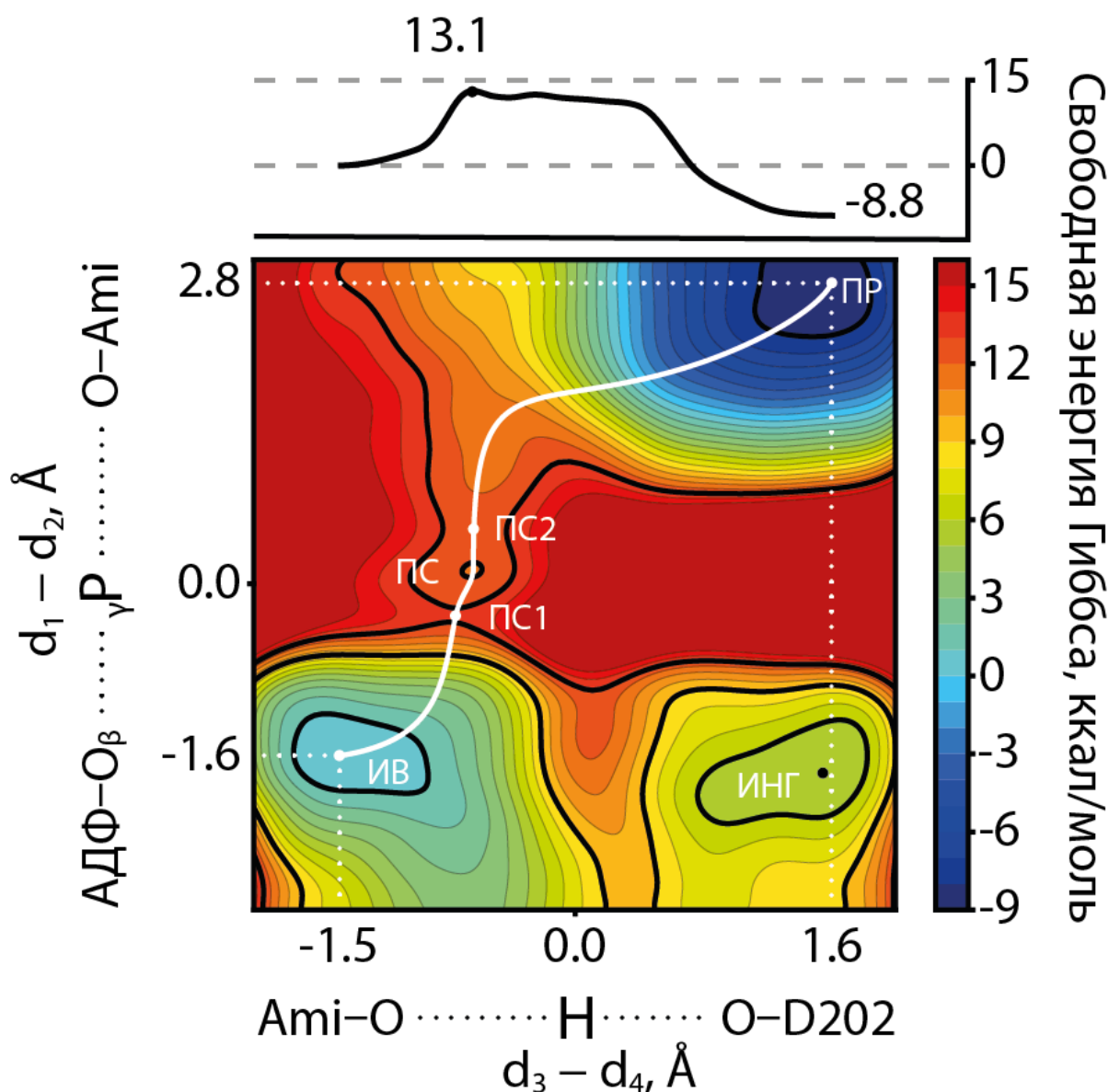


Рисунок 39. Диаграмма координаты реакции и ландшафт свободной энергии Гиббса. Точками показаны стационарные точки на пути реакции. ИВ – исходные вещества; ПС1 и ПС2 – переходные состояния; ПС – промежуточное состояние; ПР – продукты реакции; ИНГ – состояние ингибирования

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. 40, А). На втором этапе от молекулы АТФ диссоциирует 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. 40, Б). На третьей стадии реакции гидроксильная группа амикумацина активируется за счет переноса протона на остаток D202, и одновременно с этим процессом происходит образование связи P—O (рис. 40, В).

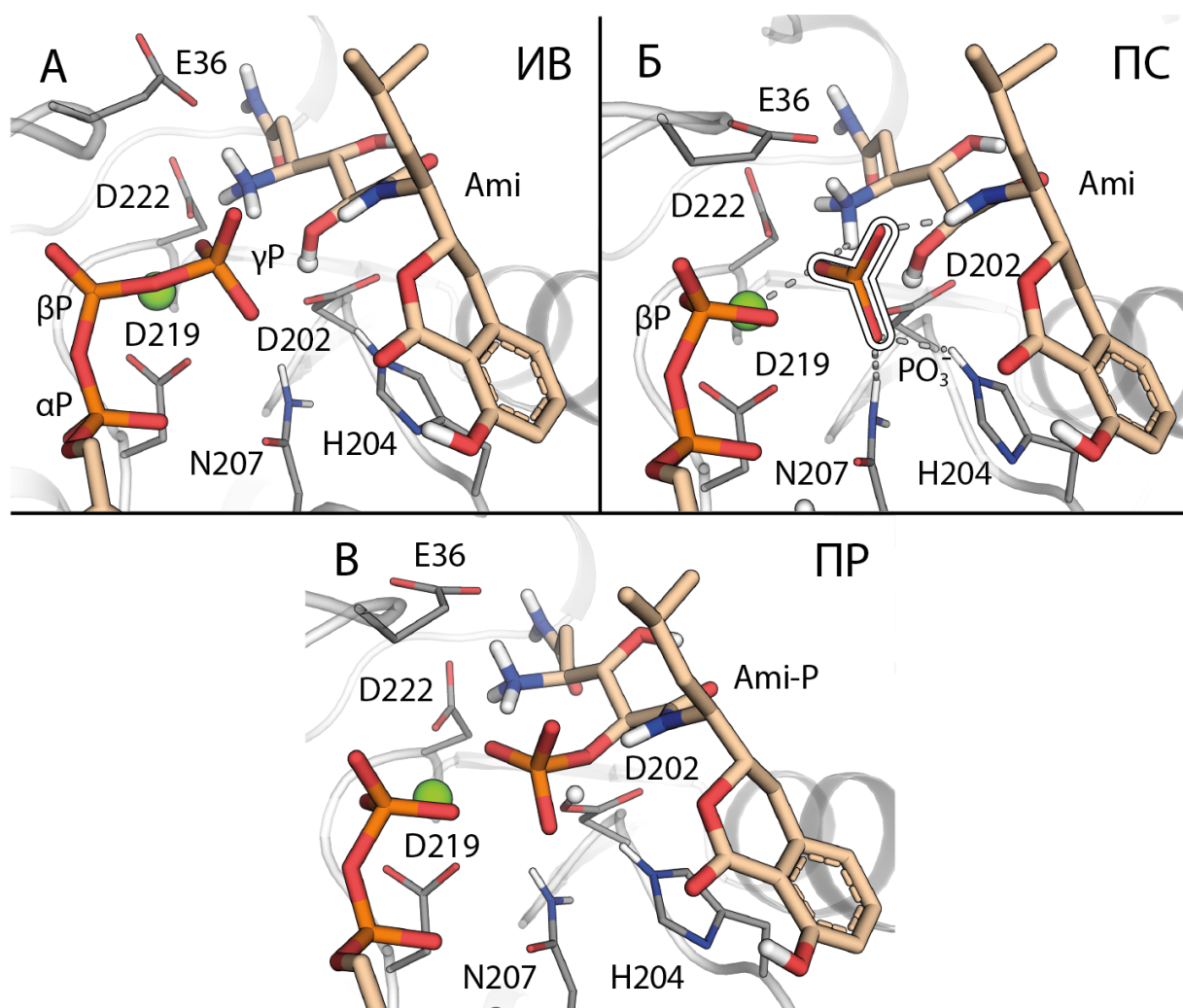


Рисунок 40. Детали реакции переноса метафосфат-аниона по диссоциативному механизму, полученные по результатам QM/MM моделирования. **А.** Подробное представление состояния с исходными веществами (ИБ): комплекс AmiN с АТФ, Ami и ионом Mg^{2+} . **Б.** Промежуточное состояние (ПС), характеризующееся AmiN в комплексе с АДФ, Ami и метафосфат анионом PO_3^- . **В.** Состояние продуктов реакции (ПР), в котором AmiN находится в комплексе с АДФ и фосфорилированным

Ami. Цветовая индикация атомов следующая: фосфор – оранжевый, кислород – красный, азот – синий, углерод – серый, водород – белым, а магний – зеленый. Перенесенный с гидроксильной группы Ami протон показан в виде белой сферы

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 амикумацин (Ami).
2. Разработана технология глубокого функционального профилирования бактериальных сообществ, позволяющая осуществлять персонафицированный 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 (APH), 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 литературы

1. Silver L.L. Challenges of antibacterial discovery // *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. Vol. 24, № 1. P. 71–109.
2. Bassett E. et al. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350) // *Science* (80-.). 1980. Vol. 209, № 4464. P. 1532–1534.
3. Cook M., Molto E.L., Anderson C. Flouochrome labelling in Roman Period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. // *Am. J. Phys. Anthr.* 1989. Vol. 80. P. 137–143.
4. Albert A. Selective Toxicity // *Journal of Chemical Information and Modeling* / ed. Albert A. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985. Vol. 53, № 9. 1689–1699 p.
5. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B.influenzae* // *Br. J. Exp. Pathol.* 1929. Vol. 10, № 1923. P. 226–236.
6. Chain E. et al. Penicillin as a Chemotherapeutic Agent // *Lancet.* 1940. Vol. 236, № 6. P. 226–228.
7. Woodruff H.B. Selman A. Waksman, winner of the 1952 nobel prize for physiology or medicine // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. Vol. 80, № 1. P. 2–8.
8. Lewis K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery // *Nature.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 485, № 7399. P. 439–440.
9. Willey J., Sherwood L., Woolverton C. Antimicrobial chemotherapy // *Prescott, Harley and Klein's Microbiology.* 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill Inc.,US, 2008. P. 835–837.
10. Liu F., Myers A.G. Development of a platform for the discovery and practical synthesis of new tetracycline antibiotics // *Current Opinion in Chemical*

Biology. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 32. P. 48–57.

11. James R.C. et al. Redesign of glycopeptide antibiotics: Back to the future // ACS Chemical Biology. NIH Public Access, 2012. Vol. 7, № 5. P. 797–804.
12. Floss H.G., Yu T.W. Rifamycin - Mode of action, resistance, and biosynthesis // Chemical Reviews. American Chemical Society, 2005. Vol. 105, № 2. P. 621–632.
13. Michalopoulos A.S., Livaditis I.G., Gougoutas V. The revival of fosfomycin // International Journal of Infectious Diseases. Elsevier, 2011. Vol. 15, № 11. P. e732–e739.
14. Eisenstein B.I., Oleson F.B., Baltz R.H. Daptomycin: From the mountain to the clinic, with essential help from Francis Tally, MD // Clinical Infectious Diseases. Oxford Academic, 2010. Vol. 50, № SUPP.1. P. S10–S15.
15. Taylor S.D., Palmer M. The action mechanism of daptomycin // Bioorganic Med. Chem. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 24, № 24. P. 6253–6268.
16. Adeyemo A.A., Oluwatosin O., Omotade O.O. Study of streptomycin-induced ototoxicity: protocol for a longitudinal study // Springerplus. SpringerOpen, 2016. Vol. 5, № 1. P. 1–9.
17. Güngör Ö.Ö.N. et al. Synthesis and antimicrobial activities of new higher amino acid Schiff base derivatives of 6-aminopenicillanic acid and 7-aminocephalosporanic acid // J. Mol. Struct. Elsevier, 2016. Vol. 1106. P. 181–191.
18. Deng S. et al. Efficient cascade synthesis of ampicillin from penicillin G potassium salt using wild and mutant penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* // J. Biotechnol. Elsevier B.V., 2016. Vol. 219. P. 142–148.
19. Gröger H. et al. Industrial landmarks in the development of sustainable production processes for the β -lactam antibiotic key intermediate 7-

- aminocephalosporanic acid (7-ACA) // *Sustain. Chem. Pharm.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 5. P. 72–79.
20. Hu Y., Zhu B. Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer // *Synthetic and Systems Biotechnology*. KeAi Communications Co., 2016. Vol. 1, № 3. P. 143–149.
 21. da Cunha B.R., Fonseca L.P., Calado C.R.C. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? // *Antibiotics*. MDPI AG, 2019. Vol. 8, № 2. P. 45.
 22. Nelson M.L., Levy S.B. The history of the tetracyclines // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Blackwell Publishing Inc., 2011. Vol. 1241, № 1. P. 17–32.
 23. Charest M.G. et al. A convergent enantioselective route to structurally diverse 6-deoxytetracycline antibiotics // *Science (80-.)*. Clarendon Press, 2005. Vol. 308, № 5720. P. 395–398.
 24. Perez M. et al. An Efficient Stereoselective Total Synthesis of All Stereoisomers of the Antibiotic Thiamphenicol through Ruthenium-Catalyzed Asymmetric Reduction by Dynamic Kinetic Resolution // *European J. Org. Chem.* Wiley-VCH Verlag, 2015. Vol. 2015, № 27. P. 5949–5958.
 25. Wright P.M., Seiple I.B., Myers A.G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery // *Angewandte Chemie - International Edition*. Wiley-VCH Verlag, 2014. Vol. 53, № 34. P. 8840–8869.
 26. Bisacchi G.S. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story” // *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society, 2015. Vol. 58, № 12. P. 4874–4882.
 27. Lee G.C. et al. Outpatient antibiotic prescribing in the United States: 2000 to 2010 // *BMC Med.* BioMed Central Ltd., 2014. Vol. 12, № 1.

28. El-Gamal M.I. et al. Recent updates of carbapenem antibiotics // *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 2017. Vol. 131. P. 185–195.
29. Fu H.G. et al. Design, synthesis and biological evaluation of monobactams as antibacterial agents against gram-negative bacteria // *Eur. J. Med. Chem.* Elsevier Masson SAS, 2016. Vol. 110. P. 151–163.
30. Slee A.M. et al. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: In vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721 // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987. Vol. 31, № 11. P. 1791–1797.
31. Brickner S.J. Oxazolidinone antibacterial agents // *Curr. Pharm. Des.* 1996. Vol. 2, № 2. P. 175–194.
32. Katz L., Baltz R.H. Natural product discovery: past, present, and future // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag, 2016. Vol. 43, № 2–3. P. 155–176.
33. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Geneva: World Health Organization, 2017. 147 p.
34. Mills S.D. When will the genomics investment pay off for antibacterial discovery? // *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 2006. Vol. 71, № 7. P. 1096–1102.
35. Land M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing // *Functional and Integrative Genomics*. Springer Verlag, 2015. Vol. 15, № 2. P. 141–161.
36. Blin K. et al. AntiSMASH 4.0 - improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2017. Vol. 45, № W1. P. W36–W41.

37. Skinnider M.A. et al. PRISM 3: Expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2017. Vol. 45, № W1. P. W49–W54.
38. Hug J.J. et al. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes // *Antibiotics.* MDPI AG, 2018. Vol. 7, № 2. P. 44.
39. Niu G., Li W. Next-Generation Drug Discovery to Combat Antimicrobial Resistance // *Trends in Biochemical Sciences.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 44, № 11. P. 961–972.
40. Hug J.J. et al. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes // *Antibiotics.* MDPI AG, 2018. Vol. 7, № 2. P. 44.
41. Qin Z. et al. Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African *Tetraponera* plant-ants // *Chem. Sci.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 8, № 4. P. 3218–3227.
42. Peek J. et al. Rifamycin congeners kanglemycins are active against rifampicin-resistant bacteria via a distinct mechanism // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 1.
43. Li Y.X. et al. Discovery of cationic nonribosomal peptides as Gram-negative antibiotics through global genome mining // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 1.
44. Panter F. et al. Self-resistance guided genome mining uncovers new topoisomerase inhibitors from myxobacteria // *Chem. Sci.* Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 9, № 21. P. 4898–4908.
45. Tang X. et al. Identification of Thiotetronic Acid Antibiotic Biosynthetic Pathways by Target-directed Genome Mining // *ACS Chem. Biol.* American Chemical Society, 2015. Vol. 10, № 12. P. 2841–2849.
46. Alanjary M. et al. The Antibiotic Resistant Target Seeker (ARTS), an

- exploration engine for antibiotic cluster prioritization and novel drug target discovery // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2017. Vol. 45, № W1. P. W42–W48.
47. Baltz R.H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Springer Verlag, 2017. Vol. 44, № 4–5. P. 573–588.
 48. Covington B.C., McLean J.A., Bachmann B.O. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites // *Natural Product Reports.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 34, № 1. P. 6–24.
 49. Senges C.H.R. et al. The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2018. Vol. 115, № 10. P. 2490–2495.
 50. Wang M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking // *Nature Biotechnology.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 34, № 8. P. 828–837.
 51. Myronovskyi M. et al. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters // *Metab. Eng.* Academic Press Inc., 2018. Vol. 49. P. 316–324.
 52. Ogasawara Y. et al. Exploring Peptide Ligase Orthologs in Actinobacteria - Discovery of Pseudopeptide Natural Products, Ketomemicins // *ACS Chem. Biol.* American Chemical Society, 2016. Vol. 11, № 6. P. 1686–1692.
 53. Hover B.M. et al. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens // *Nat. Microbiol.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 3, № 4. P. 415–422.
 54. Tan G.Y. et al. Heterologous Biosynthesis of Spinosad: An Omics-Guided

- Large Polyketide Synthase Gene Cluster Reconstitution in *Streptomyces* // ACS Synth. Biol. American Chemical Society, 2017. Vol. 6, № 6. P. 995–1005.
55. Horbal L. et al. Secondary metabolites overproduction through transcriptional gene cluster refactoring // Metab. Eng. Academic Press Inc., 2018. Vol. 49. P. 299–315.
 56. Zhang J. et al. Stress typicality effect in Chinese advanced and intermediate ESL learners // Educ. Psychol. Routledge, 2018. Vol. 38, № 5. P. 617–632.
 57. Eyles T.H., Vior N.M., Truman A.W. Rapid and Robust Yeast-Mediated Pathway Refactoring Generates Multiple New Botromycin-Related Metabolites // ACS Synth. Biol. American Chemical Society, 2018. Vol. 7, № 5. P. 1211–1218.
 58. Baltz R.H. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Springer Verlag, 2016. Vol. 43, № 2–3. P. 343–370.
 59. Phelan R.M. et al. Development of next generation synthetic biology tools for use in *streptomyces venezuelae* // ACS Synth. Biol. American Chemical Society, 2017. Vol. 6, № 1. P. 159–166.
 60. Xu M. et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp. // Appl. Environ. Microbiol. American Society for Microbiology, 2016. Vol. 82, № 19. P. 5795–5805.
 61. Kasuga K. et al. Heterologous production of kasugamycin, an aminoglycoside antibiotic from *Streptomyces kasugaensis*, in *Streptomyces lividans* and *Rhodococcus erythropolis* L-88 by constitutive expression of the biosynthetic gene cluster // Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer Verlag,

2017. Vol. 101, № 10. P. 4259–4268.
62. Kepplinger B. et al. Mode of Action and Heterologous Expression of the Natural Product Antibiotic Vancoresmycin // *ACS Chem. Biol.* American Chemical Society, 2018. Vol. 13, № 1. P. 207–214.
 63. Liu Y. et al. Molecular mechanism of lipid-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* Churchill Livingstone, 2018. Vol. 136. P. 131–141.
 64. Foulston L. Genome mining and prospects for antibiotic discovery // *Current Opinion in Microbiology.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 51. P. 1–8.
 65. Vincent M.E. et al. Microfluidic stochastic confinement enhances analysis of rare cells by isolating cells and creating high density environments for control of diffusible signals // *Chem. Soc. Rev.* Chem Soc Rev, 2010. Vol. 39, № 3. P. 974–984.
 66. Agresti J.J. et al. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2010. Vol. 107, № 9. P. 4004–4009.
 67. Churski K., Korczyk P., Garstecki P. High-throughput automated droplet microfluidic system for screening of reaction conditions // *Lab Chip.* Royal Society of Chemistry, 2010. Vol. 10, № 7. P. 816–818.
 68. Chong Z.Z. et al. Active droplet generation in microfluidics // *Lab on a Chip.* Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 16, № 1. P. 35–58.
 69. Damodaran S.P. et al. A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of *Chlamydomonas reinhardtii* // *PLoS One* / ed. Subramanyam R. Public Library of Science, 2015. Vol. 10, № 3. P. e0118987.
 70. Boitard L. et al. Growing microbes in millifluidic droplets // *Engineering in*

- Life Sciences. Wiley-VCH Verlag, 2015. Vol. 15, № 3. P. 318–326.
71. Jiang L. et al. Digital antimicrobial susceptibility testing using the MilliDrop technology // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Springer Verlag, 2016. Vol. 35, № 3. P. 415–422.
 72. Jakiela S. et al. Bacterial growth and adaptation in microdroplet chemostats // *Angew. Chemie - Int. Ed.* John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 52, № 34. P. 8908–8911.
 73. Huebner A. et al. Development of quantitative cell-based enzyme assays in microdroplets // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2008. Vol. 80, № 10. P. 3890–3896.
 74. Thallinger B. et al. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms // *Biotechnol. J.* Biotechnol J, 2013. Vol. 8, № 1. P. 97–109.
 75. Lim S.W., Tran T.M., Abate A.R. PCR-activated cell sorting for cultivation-free enrichment and sequencing of rare microbes // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 1.
 76. Sidore A.M. et al. Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2015. Vol. 44, № 7.
 77. Marcy Y. et al. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2007. Vol. 104, № 29. P. 11889–11894.
 78. Malmstrom R.R. et al. Ecology of uncultured *Prochlorococcus* clades revealed through single-cell genomics and biogeographic analysis // *ISME J.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 7, № 1. P. 184–198.

79. Churski K. et al. Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system // *Lab Chip*. Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 12, № 9. P. 1629–1637.
80. Mahler L. et al. Detection of antibiotics synthesized in microfluidic picolitre-droplets by various actinobacteria // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 13087.
81. Lok C. Mining the microbial dark matter // *Nature*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 522, № 7556. P. 270–273.
82. Ma L. et al. Individually addressable arrays of replica microbial cultures enabled by splitting SlipChips // *Integr. Biol. (United Kingdom)*. 2014. Vol. 6, № 8. P. 796–805.
83. Seyedsayamdost M.R. High-Throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, № 20. P. 7266–7271.
84. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria // *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 2001. Vol. 55, № 1. P. 165–199.
85. Boedicker J.Q., Vincent M.E., Ismagilov R.F. Microfluidic confinement of single cells of bacteria in small volumes initiates high-density behavior of quorum sensing and growth and reveals its variability // *Angew. Chemie - Int. Ed. Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. Vol. 48, № 32. P. 5908–5911.
86. Terekhov S.S. et al. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2017. Vol. 114, № 10. P. 2550–2555.
87. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. // *Protein Expr. Purif. Academic Press*, 2005. Vol. 41, № 1. P. 207–234.

88. Miller C.J. et al. Comprehensive profiling of the STE20 kinase family defines features essential for selective substrate targeting and signaling output // *PLoS Biol. Public Library of Science*, 2019. Vol. 17, № 3. P. e2006540.
89. Hutti J.E. et al. A rapid method for determining protein kinase phosphorylation specificity // *Nat. Methods. Nat Methods*, 2004. Vol. 1, № 1. P. 27–29.
90. Kevany B.M., Rasko D.A., Thomas M.G. Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus* // *Appl. Environ. Microbiol. Appl Environ Microbiol*, 2009. Vol. 75, № 4. P. 1144–1155.
91. Müller S. et al. Paenilamicin: Structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *paenibacillus larvae* // *Angew. Chemie - Int. Ed. Wiley-VCH Verlag*, 2014. Vol. 53, № 40. P. 10821–10825.
92. Reimer D. et al. A natural prodrug activation mechanism in nonribosomal peptide synthesis // *Nat. Chem. Biol. Nature Publishing Group*, 2011. Vol. 7, № 12. P. 888–890.
93. Vizcaino M.I., Crawford J.M. The colibactin warhead crosslinks DNA // *Nat. Chem. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 7, № 5. P. 411–417.
94. Nougayrède J.P. et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells // *Science (80-.). Science*, 2006. Vol. 313, № 5788. P. 848–851.
95. Park H.B. et al. Activating and attenuating the amicoumacin antibiotics // *Molecules. MDPI AG*, 2016. Vol. 21, № 7.
96. McKay G.A., Thompson P.R., Wright G.D. Broad Spectrum Aminoglycoside Phosphotransferase Type III from *Enterococcus*: Overexpression, Purification, and Substrate Specificity // *Biochemistry. Biochemistry*, 1994.

Vol. 33, № 22. P. 6936–6944.

97. Perlin M.H., Lerner S.A. High-level amikacin resistance in *Escherichia coli* due to phosphorylation and impaired aminoglycoside uptake // *Antimicrob. Agents Chemother.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1986. Vol. 29, № 2. P. 216–224.
98. Cox G. et al. Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylyltransferase ANT(2'')-Ia // *MBio. American Society for Microbiology*, 2015. Vol. 6, № 1.
99. Magalhaes M.L.B., Blanchard J.S. The kinetic mechanism of AAC(3)-IV aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli* // *Biochemistry. NIH Public Access*, 2005. Vol. 44, № 49. P. 16275–16283.
100. Zygmunt D.J., Stratton C.W., Kernodle D.S. Characterization of four β -lactamases produced by *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992. Vol. 36, № 2. P. 440–445.
101. Jacobsen D.M. et al. Price to be paid for two-metal catalysis: Magnesium ions that accelerate chemistry unavoidably limit product release from a protein kinase // *J. Am. Chem. Soc. UTC*, 2012. Vol. 134, № 37. P. 15357–15370.
102. Storer A.C., Cornish Bowden A. Concentration of MgATP²⁻ and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions // *Biochem. J. Portland Press Ltd*, 1976. Vol. 159, № 1. P. 1–5.

Приложение

1. Праймеры

Создание генетических конструкций, кодирующих киназы AmiN и hAmiN и фосфатазу AmiO

Праймер	Последовательность (5'-3')
amiN_F	ATATACATATGCATAAAGAAGTAAAAGCACGATACGATG
amiN_R	ATATAGGATCCTCATTAAGATTGACTTAGCTTTGTAAAGT CAAACGTCG
hamiN_F	ATATACATATGCATAAAGAAGTAAAAGCACGATACGATG
hamiN_R	ATATAGGATCCTCATTATGTTGTTAGCTGATGAAAGTCA AAAGGCG
amiO_F	ATATACATATGGGCTATATGGATCGTAAAAAACGTATTT TTCT
amiO_R	ATATAGGATCCTCATTATGGGCGATAGGTGGACGGTG
yerI_F	TTATATGGATCCTATATGATGGGAGAGATGGAATG
yerI_R	TTATATCTCGAGCGTAGTTGTCCTGGCTTTTC

Сайт-направленный мутагенез киназы AmiN

Мутация	Прямой праймер	Обратный праймер
K3A	GGAGAAATTACATATGCA TGCGGATGTAAAAGCCAT ATATG	CATATATGGCTTTTACATCCG CATGCATATGTAATTTCTCC
E36A	CGCAGATGCAGCAAАСТА TGTGTATGAAC	G TTCATACACATAGTTTGCTG CATCTGCG

E36Q	CCACTTTATCGCAGATGCA CAGAACTATGTGTATGAA C	G TTCATACACATAGTTCTGTG CATCTGCGATAAAGTGG
E36D	CGCAGATGCAGATAACTA TGTGTATGAAC	G TTCATACACATAGTTATCTG CATCTGCG
N37A	CGCAGATGCAGAAGCCTA TGTGTATGAAC	G TTCATACACATAGGCTTCTG CATCTGCG
K52A	GGAGAGTCTTTCATTTTAG CGATTACCCATACCATCCG C	G CGGATGGTATGGGTAATCGC TAAAATGAAAGACTCTCC
R58A	CCCATACCATCGCCAGATC ACCTGATTATATTTTAGG	C CTAAAATATAATCAGGTGAT CTGGCGATGGTATGGG
R59A	CCCATACCATCCGCGCGTC ACCTGATTATATTTTAGG	C CTAAAATATAATCAGGTGAC GCGCGGATGGTATGGG
E159A	GAGTGGGATGAAGCGGAG CAGCTTAAATTG	C AATTTAAGCTGCTCCGCTTC ATCCCCTC
E159Q	GAGTGGGATGAACAGGAG CAGCTTAAATTG	C AATTTAAGCTGCTCCTGTTC ATCCCCTC
E160A	GGGATGAAGAGGCGCAGC TTAAATTGC	G CAATTTAAGCTGCGCCTCTT CATCCC
Q161A	GGGATGAAGAGGAGGCGC TTAAATTGCGTAAG	C TTACGCAATTTAAGCGCCTC CTCTTCATCCC
Q161E	GTGGGATGAAGAGGAGGA ACTTAAATTGCGTAAG	C TTACGCAATTTAAGTTCCTC CTCTTCATCCCAC
Q161H	GGATGAAGAGGAGCATCT TAAATTGCGTAAG	C TTACGCAATTTAAGATGCTC CTCTTCATCC
Q161K	GTGGGATGAAGAGGAGAA ACTTAAATTGCGTAAG	C TTACGCAATTTAAGTTTCTCC TCTTCATCCCAC

Q161N	GTGGGATGAAGAGGAGAA CCTTAAATTGCGTAAG	CTTACGCAATTTAAGGTTCTC CTCTTCATCCCAC
Q161R	GGGATGAAGAGGAGCGTC TTAAATTGCGTAAG	CTTACGCAATTTAAGACGCTC CTCTTCATCCC
H200A	CGTACGGATTGGTTGCGG CGGATCTTCATCACG	CGTGATGAAGATCCGCCGCAA CCAATCCGTACG
D202N	GGATTGGTTCATGCGAATC TTCATCACGG	CCGTGATGAAGATTCGCATGA ACCAATCC
D202A	GGATTGGTTCATGCGGCG CTTCATCACGGAAAC	GTTTCCGTGATGAAGCGCCGC ATGAACCAATCC
D202E	GGTTCATGCGGAGCTTCAT CACGG	CCGTGATGAAGCTCCGCATGA ACC
H204F	GGTTCATGCGGATCTTTTT CACGGAAACTTCC	GGAAGTTTCCGTGAAAAAGAT CCGCATGAACC
H204A	GGTTCATGCGGATCTTGCG CACGGAAACTTCCAC	GTGGAAGTTTCCGTGCGCAAG ATCCGCATGAACC
H205A	CATGCGGATCTTCATGCCG GAAACTTCCAC	GTGGAAGTTTCCGGCATGAAG ATCCGCATG
N207A	GGATCTTCATCACGGAGC CTTCCACTGGGATC	GATCCCAGTGGAAGGCTCCGT GATGAAGATCC
N207D	CTTCATCACGGAGACTTCC ACTGGG	CCCAGTGGAAGTCTCCGTGAT GAAG
N207H	CTTCATCACGGACACTTCC ACTGGG	CCCAGTGGAAGTGTCCGTGAT GAAG
D219A	GCAAAATTACGACCTTTGC GTTCGATGATATCGGG	CCCGATATCATCGAACGCAAA GGTCGTAATTTTGC
D221A	CGACCTTTGATTTGCGGGA TATCGGGTACAATTGG	CCAATTGTACCCGATATCCGC GAAATCAAAGGTTCG

D222A	CGACCTTTGATTTCGATGC GATCGGGTACAATTGG	CCAATTGTACCCGATCGCATC GAAATCAAAGGTCG
W241A	GCTATAACAATGTGTTGGCG TACCCAGTCATTCCG	CGGAATGACTGGGTACGCCAA CACATTGTATAGC
Y242A	CAATGTGTTGTGGGCCCCA GTCATTCCG	CGGAATGACTGGGGCCCACA ACACATTG
R286Q	GACTTCCTTCGCTTAGCGC ACGTGCTAATCTATGG	CCATAGATTAGCACGTGCGCT AAGCGAAGGAAGTC
Q296E	GGCTTGCTGCATGAAGCA TTTGATTTG	CAAATCAAATGCTTCATGCAG CAAGCC