

Биоинформатический анализ генного кластера *Achromobacter insolitus* LCu2, кодирующего белки трех систем эффлюкса

^{1,2,3}Г.Л. Бурьгин*, ^{1,2}Ю.А. Балабанова

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Российская Федерация, 410049, Саратов, пр-кт Энтузиастов 13

²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Российская Федерация, 410012, Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина 4/3

³Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Российская Федерация, 410012, Саратов, ул. Астраханская 83

*E-mail: burygingl@gmail.com

Резюме

Массовое применение антибиотиков в медицине и ветеринарии приводит к появлению большого количества бактерий, устойчивых к различным токсикантам. Одним из молекулярных механизмов бактериальной резистентности является функционирование систем эффлюкса RND-типа, удаляющие из клеток антибиотики и катионы тяжелых металлов. Целью данного исследования является характеристика биоинформатическими методами генного кластера бактерии *Achromobacter insolitus* LCu2, содержащего 3 оперона систем эффлюкса AxyXY-OprZ, MexVW-TolC и MexJK-OprM. Верифицирована аннотация каждого из генов с функциональным разделением генов каждого оперона на компоненты цитоплазматической мембраны, наружной мембраны и периплазматические адаптеры. На N-концах белков периплазмы и наружной мембраны выявлены сигнальные последовательности размером от 15 до 50 аминокислотных остатков. Аминокислотные последовательности аналогичных белков разных оперонов имели низкий процент идентичности (24-31%). При этом 3D-моделирование показало способность всех белков образовывать надмолекулярные комплексы, необходимые для функционирования систем эффлюкса. Предположено, что расположение генов трёх систем эффлюкса в одном генном кластере способствует одновременной активации защитных механизмов клеток к широкому спектру токсинов.

Ключевые слова: RND-система эффлюкса, 3D-моделирование, AlphaFold 3, множественная лекарственная устойчивость, *Achromobacter insolitus* LCu2

Цитирование: Бурьгин Г.Л., Балабанова Ю.А. Биоинформатический анализ генного кластера *Achromobacter insolitus* LCu2, кодирующего белки трех систем эффлюкса. *Biomics*. 2025. 17(4). 275-281. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-24

© Авторы, Бурьгин Г.Л., Балабанова Ю.А., 2025

Bioinformatics analysis of the gene cluster from *Achromobacter insolitus* LCu2 encoding proteins of three efflux systems

^{1,2,3}G.L. Burygin*, ^{1,2}J.A. Balabanova

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 410049, Saratov, 13 Prospekt Entuziastov

²Vavilov University, Russian Federation, 410012, Saratov, 4/3 Pyotr Stolypin Avenue

³Saratov State University, Russian Federation, 410012, Saratov, 83 Astrakhanskaya str.

*E-mail: burygingl@gmail.com

Resume

The widespread use of antibiotics in human and veterinary medicine leads to the emergence of many bacteria resistant to various toxicants. One of the molecular mechanisms of bacterial resistance is the functioning of RND-type efflux systems, which remove antibiotics and heavy metal cations from cells. The aim of this study was to use bioinformatics to characterize the gene cluster of the bacterium *Achromobacter insolitus* LCu2, which contains three efflux system operons: AxyXY-OprZ, MexVW-TolC, and MexJK-OprM. The annotation of each gene was verified, with the genes of each operon functionally divided into components of the cytoplasmic membrane, outer membrane, and periplasmic adapters. Signal sequences ranging from 15 to 50 amino acid residues were identified at the N-termini of the periplasmic and outer membrane proteins. The amino acid sequences of similar proteins from different operons had a low level of identity (24-31%). However, 3D modeling demonstrated the ability of all proteins to form supramolecular complexes necessary for the functioning of efflux systems. It is hypothesized that the location of the genes for three efflux systems in a single gene cluster facilitates the simultaneous activation of cellular defense mechanisms against a wide range of toxins.

Keywords: RND-system efflux, 3D modeling, AlphaFold 3, multidrug resistance, *Achromobacter insolitus* LCu2

Citation: Burygin G.L., Balabanova J.A. Bioinformatics analysis of the gene cluster from *Achromobacter insolitus* LCu2 encoding proteins of three efflux systems. *Biomcs.* 2025. 17(4). 275-281. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-24 (In Russian)

© The Authors, Burygin G.L., Balabanova J.A., 2025

Введение

В связи с массовым применением антибиотиков в медицине и ветеринарии в различных природных экосистемах появляется большое количество бактерий, устойчивых к антибиотикам. Наибольшее практическое значение из них имеют так называемые бактерии с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), которые всё чаще становятся причиной внутрибольничных инфекций, связанных с их резистентностью к широкому кругу современных применяемых антибиотиков и ослабленным иммунитетом пациентов на фоне антибиотикотерапии [Permanik et al., 2022]. Молекулярным механизмом формирования у бактерий МЛУ является функционирование разнообразных систем эффлюкса токсикантов, каждая из которых относительно неспецифично может выводить из клетки несколько разных токсикантов.

В аспекте развития МЛУ у бактерий интерес исследователей вызывают системы эффлюкса RND-типа, которые в виде единого сложного надмолекулярного белкового комплекса формируют пору через цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку (у грамотрицательных бактерий через периплазму и наружную мембрану). Показано, что RND-системы вовлечены в проявление устойчивости бактерий не только к антибиотикам, но и к тяжёлым металлам, детергентам и другим токсинам [Colclough et al., 2020]. В последние годы активно обсуждаются примеры повышения антибиотикоустойчивости бактерий при их адаптации к высоким концентрациям тяжёлых металлов [Zhang et al., 2025]. В связи с этим, ранее описанные

биотехнологически перспективные бактериальные штаммы, обладающие устойчивостью к тяжёлым металлам, потенциально могут быть антибиотикорезистентными.

Изучение специфичности и функционирование RND-систем эффлюкса для бактерий с МЛУ является нетривиальной задачей, так как многие классические методы генетики микроорганизмов не применимы к таким бактериям. Например, при транспозонном нокаут-мутагенеза для селекции модифицированных культур требуется чувствительность исходного штамма к нескольким антибиотикам, а бактерии с МЛУ устойчивы к большинству антибиотиков. Для гетерологической экспрессии генов RND-систем эффлюкса необходимо перенесение всех генов системы в клетки-реципиенты, что часто затрудняет процесс из-за большой протяжённости нуклеотидных последовательностей оперона. Другие современные методы трансформации бактериальных клеток, например технология редактирования генома, предлагают новые подходы, которые могут стать перспективными для изучения таких сложных надмолекулярных комплексов, как RND-системы эффлюкса.

Предварительным этапом молекулярно-генетических экспериментов является биоинформатическая характеристика целевых фрагментов генома, выбранных для трансформации. В данной работе проанализирован генный кластер, содержащий три оперона различных RND-систем эффлюкса, из генома штамма *Achromobacter insolitus* LCu2, проявляющего устойчивость к антибиотикам и тяжёлым металлам.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности были получены из базы данных GenBank для генома штамма *Achromobacter insolitus* LCu2 (номер доступа: CP038034.1). Поиск генов проводили с использованием алгоритма BLASTN, верификацию аннотации в программе SmartBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/>). Парное сравнение предсказанных аминокислотных последовательностей целевых генов осуществляли в программе LALIGN (<https://web.expasy.org/sim/>). 3D-моделирование белковых комплексов проводили с применением ресурса AlphaFold 3 (<https://alphafoldserver.com/>). Для оценки достоверности полученных моделей использовали параметр ipTM: значения выше 0,8 принимали как модель с высокой достоверностью расположения субъединиц, значение ниже 0,6 как недостоверные модели. Сигнальные пептиды в составе белковых молекул определяли с помощью алгоритма DeepTMHMM [Hallgren et al.,

2022] на сайте DTU Health Tech (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>).

Результаты и их обсуждение

Бактериальный штамм *A. insolitus* LCu2 был нами выделен из почвы, загрязнённой хлоридом меди (II) и гербицидом глифосатом [Kryuchkova et al., 2024]. Для данного штамма показана устойчивость к высоким концентрациям катионов меди, кадмия, свинца, цинка, кобальта, никеля [Burygin et al., 2025] и широкому спектру антибиотиков. В геноме штамма *A. insolitus* LCu2, состоящего из 1 хромосомы, в положении 5 083 387..5 106 506 нами был найден генный кластер, содержащий последовательно расположенные опероны трёх различных RND-систем эффлюкса: АхуXY-OprZ, MexVW-TolC и MexJK-OprM (Рисунок 1). Кроме генов, указанных белков, в кластере выявлены гены транскрипционных регуляторов АхуZ (номер доступа: QEK94619), DeoR (QEK94623), MexL (QEK94629) и IclR (QEK94633). Общая протяжённость кластера – 23120 п.о.

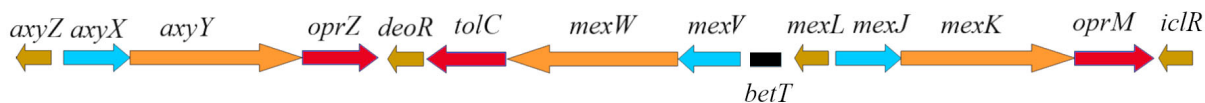


Рис. 1. Схема генного кластера в геноме штамма *A. insolitus* LCu2, содержащего опероны АхуXY-OprZ, MexVW-TolC и MexJK-OprM. Оранжевые стрелки – эффлюкс-транспортёры цитоплазматической мембраны; голубые стрелки – белки-адаптеры в периплазме; красные стрелки – эффлюкс-транспортёры наружной мембраны; коричневые стрелки – транскрипционные регуляторы.

Fig. 1. Scheme of the gene cluster in the *A. insolitus* LCu2 genome, containing the operons АхуXY-OprZ, MexVW-TolC and MexJK-OprM. Orange arrows – efflux transporters of the cytoplasmic membrane; blue arrows – adapter proteins in the periplasm; red arrows – efflux transporters of the outer membrane; brown arrows – transcriptional regulators.

Анализ гомологов найденных генов показал, что белки АхуY (QEK94621), MexW (QEK94625) и MexK (QEK94631) являются трансмембранными компонентами RND-систем эффлюкса, расположенными в цитоплазматической мембране; белки OprZ (QEK94622), TolC (QEK94624) и OprM (QEK94632) – трансмембранными компонентами наружной мембраны; белки АхуX (QEK94620), MexV (QEK94626) и MexJ (QEK94630) – периплазматические адаптеры между двумя трансмембранными компонентами.

Попарное сравнение аминокислотных последовательностей в каждой из функциональных групп белков, показало, что у белков АхуY, MexW и MexK идентичность последовательностей составляет 24-31%, сходство – 43-52%. Для белков OprZ, TolC и OprM идентичность аминокислотных последовательностей была 28-30%, сходство – 42-47%. И для белков АхуX, MexV и MexJ идентичность – 24-28%, сходство – 38-42%. Эти данные свидетельствуют

о том, что филогенетически белки внутри групп имеют существенные различия в первичной структуре, что может определять их различия в специфичности взаимодействия с разными токсикантами.

Для *Achromobacter xylosoxidans* ранее было показано, что система эффлюкса АхуXY-OprZ вовлечена преимущественно в формирование устойчивости к аминогликозидам (тобрамицину, амикацину, нетилмицину и гентамицину), а нарушение активности гена *axyY* приводило к повышению чувствительности к аминогликозидам, карбопенемам, тетрациклинам и эритромицину [Badot et al., 2013]. MexVW комплекс описан для *Pseudomonas aeruginosa*, у которой вместе с OprM обеспечивают устойчивость к фторхинолонам, тетрациклину, хлорамфениколу, эритромицину и акрифлавину [Li et al., 2003]. В геноме штамма *A. insolitus* LCu2 гены белков MexVW находятся в одном опероне с геном белка TolC, что может свидетельствовать о вариации функционирования

этой RND-системы эффлюкса у разных бактерий. MexJK-OprM система эффлюкса также ранее была описана для *Pseudomonas aeruginosa* [Amieva et al., 2022] с предсказанием участия в устойчивости к эритромицину и Rqs-зависимом кворум сенсинге.

Анализ доменной структуры исследуемых белков выявил сигнальные пептиды на N-концах всех

периплазматических адаптеров и компонентов наружной мембраны. Длины сигнальных пептидов составили 34 а.о. у белка AxyX, 27 а.о. у белка MexV, 50 а.о. у белка MexJ, 15 а.о. у белка OprZ, 25 а.о. у белка TolC и 21 а.о. у белка OprM.

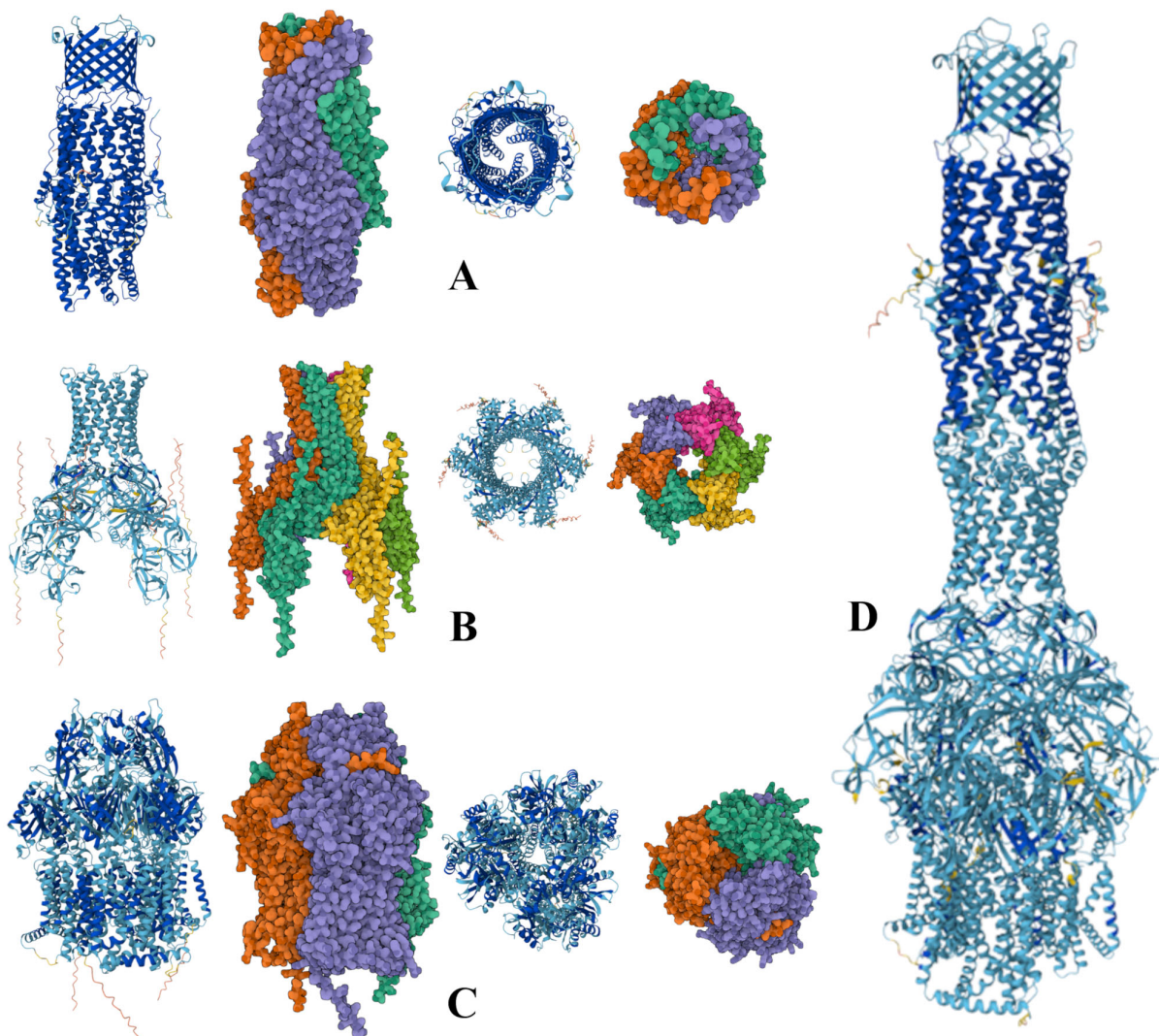


Рис. 2. Результаты 3D-моделирования надмолекулярных комплексов (фронтальная и горизонтальная проекции) тримеров белка OprZ (A), гексамеров белка AxyX (B), тримеров белка AxyY (C) и полного комплекса (фронтальная проекция) RND-системы эффлюкса AxyY₃-AxyX₆-OprZ₃ (D).

Fig. 2. Results of 3D modeling of supramolecular complexes (frontal and transverse planes) of OprZ protein trimers (A), AxyX protein hexamers (B), AxyY protein trimers (C), and the complete complex (frontal plane) of the RND efflux system AxyY₃-AxyX₆-OprZ₃ (D).

В качестве параметра биоинформатической оценки функциональности белков нами были построены 3D-модели надмолекулярных комплексов RND-систем эффлюкса для каждого из оперонов (Рисунки 2, 3, 4). По литературным данным известно, что для функционирования RND-систем эффлюкса должна сформироваться пора, состоящая из трёх субъединиц компонента цитоплазматической мембраны, шести субъединиц периплазматического адаптера, и трёх субъединиц компонента наружной мембраны. При моделировании структур белков

использовали аминокислотные последовательности с удаленными сигнальными пептидами. На рисунках 2, 3, 4 можно видеть, что все анализируемые нами белки при моделировании образовывали необходимые тримеры и гексамеры с высоким значением rTM .

Для всех трёх RND-систем эффлюкса предсказано формирование полноценной поры. При этом значение rTM для полного комплекса повышалось в связи с образованием большого количества связей между субъединицами, что уменьшало неопределённость положения фрагментов белковых молекул.

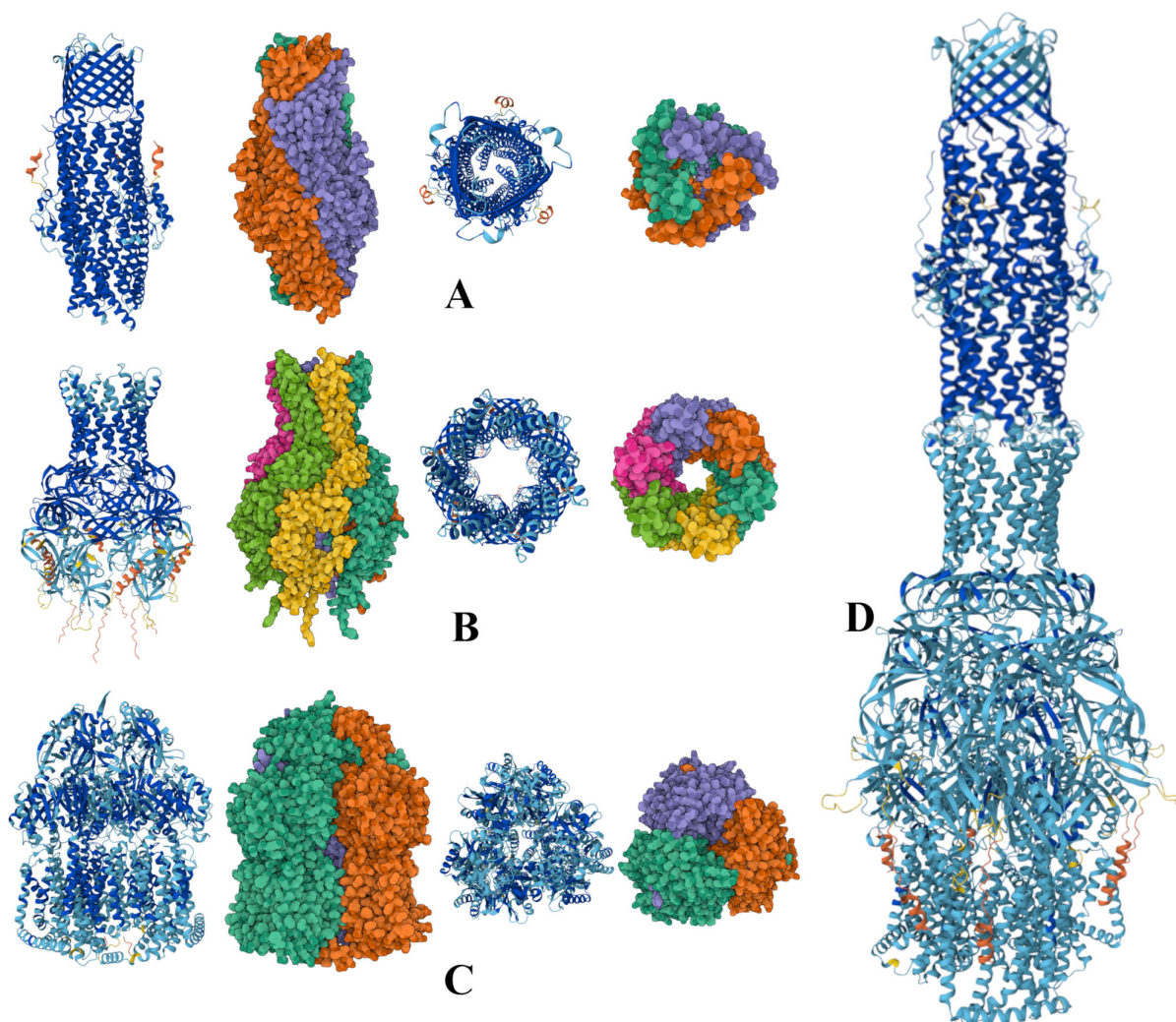


Рис. 3. Результаты 3D-моделирования надмолекулярных комплексов (фронтальная и горизонтальная проекции) тримеров белка TolC (A), гексамеров белка MexV (B), тримеров белка MexW (C) и полного комплекса (фронтальная проекция) RND-системы эффлюкса MexW₃-MexV₆-TolC₃ (D).

Fig. 3. Results of 3D modeling of supramolecular complexes (frontal and transverse planes) of TolC protein trimers (A), MexV protein hexamers (B), MexW protein trimers (C), and the complete complex (frontal plane) of the RND efflux system MexW₃-MexV₆-TolC₃ (D).

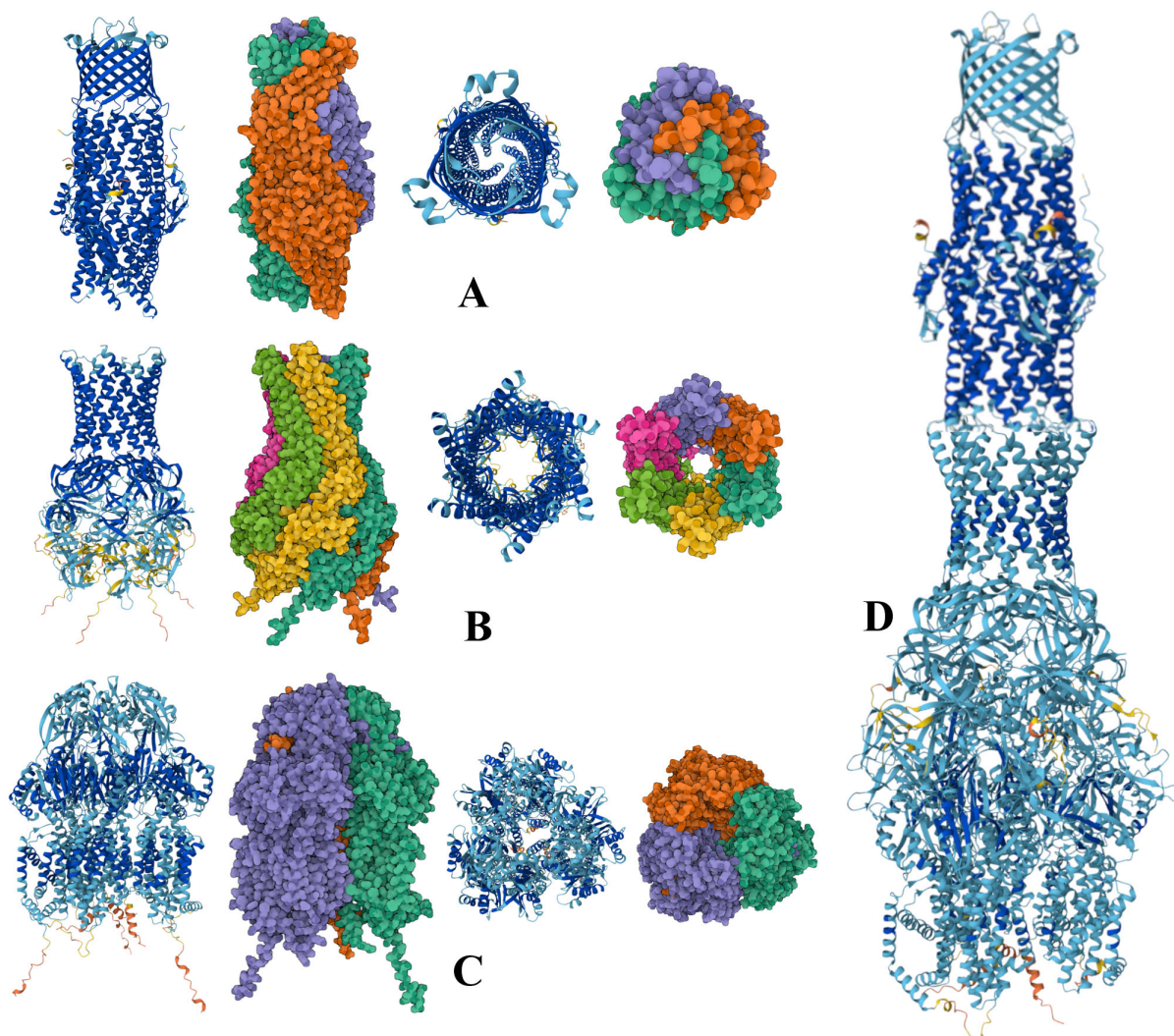


Рис. 4. Результаты 3D-моделирования надмолекулярных комплексов (фронтальная и горизонтальная проекции) тримеров белка OprM (A), гексамеров белка MexJ (B), тримеров белка MexK (C) и полного комплекса (фронтальная проекция) RND-системы эффлюкса MexK₃-MexJ₆-OprM₃ (D).

Fig. 4. Results of 3D modeling of supramolecular complexes (frontal and transverse planes) of OprM protein trimers (A), MexJ protein hexamers (B), MexK protein trimers (C), and the complete complex (frontal plane) of the RND efflux system MexK₃-MexJ₆-OprM₃ (D).

Заключение

Таким образом, для трёх RND-систем эффлюкса штамма *Achromobacter insolitus* LCu2, гены которых расположены в одном генном кластере, предсказана функциональная активность – способность формировать надмолекулярный комплекс в виде поры через цитоплазматическую мембрану, периплазму и наружную мембрану. У каждого из оперонов имеется специфический транскрипционный регулятор, но

расположение в одном генном кластере предполагает более скоординированную активность трёх оперонов за счёт отсутствия сверхспирализации ДНК при активации одного из оперонов. Несмотря на функциональное и надмолекулярное структурное сходство исследованных нами RND-систем штамма *A. insolitus* LCu2, установлены существенные различия в первичной структуре белков, являющихся функциональными аналогами в разных системах

эффлюкса. Это, возможно, определяет специфичность взаимодействия каждой из RND-систем с веществами для их удаления из клеток. В результате анализа генного кластера можно предположить, что взаимодействие клеток *A. insolitus* LCu2 с токсикантом (антибиотиком, тяжёлым металлом и детергентом), способного вызвать через транскрипционный фактор активацию одного из оперонов генного кластера, будет способствовать повышению активности и двух других оперонов за счёт стерического фактора. При этом, защищаясь от одного из токсикантов, бактериальные клетки будут активировать защитные механизмы от других токсикантов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 24-24-00520).

Литература / References

1. Amieva R, Gil-Gil T, Martínez JL, Alcalde-Rico M. The MexJK multidrug efflux pump is not involved in acquired or intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but modulates the bacterial quorum sensing response. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(14). 7492. doi: 10.3390/ijms23147492
2. Burygin GL, Astankova AS, Chumakov DS et al. Effect of silver nanoclusters on the copper resistance of *Achromobacter insolitus* LCu2. *Microbiology.* 2025. 94(2). 299-301. doi: 10.1134/S002626172460993X
3. Bador J, Amoureux L, Blanc E, Neuwirth C. Innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-type multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. 57(1). :603-605. doi: 10.1128/aac.01243-12
4. Colclough AL, Alav I, Whittle EE et al. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. *Future Microbiology.* 2020. 15. 143-157. doi: 10.2217/fmb-2019-0235
5. Hallgren J, Tsirigos KD, Pedersen MD et al. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *bioRxiv.* 2022. 2022-04. doi: 10.1101/2022.04.08.487609
6. Kryuchkova YV, Neshko AA, Gogoleva NE et al. Genomics and taxonomy of the glyphosate-degrading, copper-tolerant rhizospheric bacterium *Achromobacter insolitus* LCu2. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2024. 117. 105. doi: 10.1007/s10482-024-01989-3
7. Li Y, Mima T, Komori Y et al. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2003. 52(4). 572-575. doi: 10.1093/jac/dkg390
8. Parmanik A, Das S, Kar B et al. Current treatment strategies against multidrug-resistant bacteria: a review. *Cur Microbiol.* 2022. 79(12). 388. doi: 10.1007/s00284-022-03061-7
9. Zhang C, Geng M, Zhang G et al. Signaling molecules accelerate the transmission of antibiotic resistance genes under the stress of copper. *J Environ Manag.* 2025. 393. 127013. doi: 10.1016/j.jenvman.2025.127013