

На правах рукописи

ШУР Кирилл Владимирович

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА *whiB7* И ГЕНОВ ЕГО РЕГУЛОНА В ПРИРОДНОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У МИКОБАКТЕРИЙ**

Специальность 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,

ПЕТРОВА Майя Александровна, заведующий сектором анализа и хранения микроорганизмов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, г. Москва.

Доктор биологических наук,

МАНУХОВ Илья Владимирович, заведующий лабораторией молекулярной генетики, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

Защита состоится «__» мая 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119333, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru , тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. *Mycobacterium tuberculosis* - возбудитель туберкулеза, который является одним из самых опасных заболеваний и основной причиной смертности людей от бактериальных инфекций [WHO, 2015]. Несмотря на сокращение заболеваемости туберкулезом (с 1990 года на 47%), растет доля случаев заболевания лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза. Примерно половина таких случаев приходится на Индию, Китай и Россию.

Серьезную проблему при лечении устойчивых форм представляет наличие у возбудителя заболевания, *M. tuberculosis*, системы генов природной лекарственной устойчивости (резистом) и антибиотикотолерантности.

Действие генов резистома характеризуется осуществлением устойчивости к антибиотикам, не связанной с появлением мутаций в генах-мишенях антибиотиков. Резистом является многокомпонентной системой, включающей в себя гены, осуществляющие прием сигнала и ответ на проникновение антибиотика в клетку, транспорт антибиотиков или их производных из клетки, гены инактивации антибиотиков и др [Perry et al., 2014].

Ключевым регулятором природной устойчивости, входящим в семейство белков *WhiB-like*, является глобальный регулятор транскрипции *WhiB7* [Burian et al., 2013]. Известно, что у штаммов, мутантных по гену *whiB7*, повышена чувствительность к ряду лекарственных препаратов, в том числе тетрациклину, макролидам и аминогликозидам. *WhiB7*, как регулятор транскрипции, контролирует экспрессию ряда генов, так называемого регулона. В его состав входят двенадцать генов, среди которых в реализации природной устойчивости выделяют: *eis* (ген аминогликозид-ацетилтрансферазы) – к аминогликозидным антибиотикам, *erm37* (ген рибосомальной РНК-метилтрансферазы) – к макролидным, *tap* (ABC транспортер) – к аминогликозидным и тетрациклиновым, *rv1473* (MFS транспортер) – к макролидным антибиотикам [Ramón-García et al., 2013].

Помимо систем, осуществляющих активную устойчивость к антибиотикам, существует антибиотикотолерантность. Толерантность - способность микроорганизмов существовать в присутствии токсичных химиопрепаратов из-за уменьшенного количества аутолитических ферментов без сохранения способности к размножению. Одним из механизмов осуществления толерантности к антибиотикам (невосприимчивости) является действие систем токсин-антитоксин (ТА). При определенных условиях, например, при стрессе, вызванном антибиотиком, происходит снижение экспрессии генов ТА-модуля. Лабильный белок антитоксина деградирует быстрее активного белка токсина, что негативно влияет на трансляцию, репликацию, синтез АТФ и образование клеточной стенки [Sala et al., 2014]. Таким образом, функциональное значение систем ТА в клетках *M. tuberculosis* сводится к адаптации клетки к стрессовым условиям, в том числе вызванными антибиотиками, и перевод клеток в дормантное состояние, в котором у них практически останавливается метаболизм. Такие клетки становятся толерантными (не восприимчивыми) к действию антибиотиков (антибиотик, действующий на внутриклеточную мишень, не влияет на жизнеспособность «спящей» бактерии) [Zauchikova et al., 2015].

Расшифровка механизмов взаимодействия генов резистома, а также работы генов систем токсин-антитоксин, определение их вклада в индукцию лекарственной устойчивости и антибиотикотолерантности у *M. smegmatis* mc² 155, модельного организма для изучения возбудителя туберкулеза – *M. tuberculosis*, необходима для разработки эффективных курсов лечения больных, страдающих, в том числе латентной формой заболевания, и снижения риска возникновения опасных форм туберкулеза.

Разработанность темы исследования. На сегодняшний день широко исследуются механизмы возникновения и реализации лекарственной устойчивости патогенных бактерий, в том числе возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis*. Основными факторами, через которые реализуется лекарственная устойчивость, являются: проницаемость клеточной стенки

[Nguyen, 2016], мутации в генах, кодирующих мишени действия лекарств (например, устойчивость к рифампицину [Andre et al., 2017]), горизонтальный перенос генов лекарственной устойчивости [Reva et al., 2015], функционирование систем генов токсин-антитоксин [Sala et al., 2014] и продуктов генов резистоста [Perry et al., 2014]. У *M. tuberculosis* существуют все перечисленные системы, осуществляющие лекарственную устойчивость, за исключением горизонтального переноса генов [Reva et al., 2015].

Функциональное значение систем ТА в клетках *M. tuberculosis* сводится к их адаптации к стрессовым условиям, в том числе вызванным антибиотиками, и перевод клеток в дормантное состояние [Sala et al., 2014]. Таким образом, клетки становятся невосприимчивыми к действию антибиотиков (толерантными).

Активной системой защиты от антибиотиков является функционирование продуктов генов резистоста, который включает в себя многочисленные мембранные транспортеры, осуществляющие выброс лекарств из клеток, а также транскрипционные регуляторы генов, кодирующие белки, участвующие в активной устойчивости к антибиотикам (модификаторы мишеней, лекарств и др.) [Nguyen, 2016].

Одним из таких ключевых и широко исследуемых регуляторов является транскрипционный фактор WhiB7. WhiB7 в ответ на проникновение антибиотиков в клетку активирует экспрессию генов регулона, продукты которых осуществляют как транспорт антибиотиков из клетки (*tap*, *rv1473*), так и модификацию лекарств и мишеней (*eis*, *erm37*) [Morris et al., 2005]. Однако на сегодняшний день полный фенотип лекарственной устойчивости, определяемой данным транскрипционным фактором, не известен.

Установлено, что после первичной обработки *M. tuberculosis* антибиотиками группы аминогликозидов в низких дозах и при последующем воздействии антибиотиками других классов, наблюдается рост уровня лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к последним, что является одним из примеров проявления перекрестной лекарственной устойчивости [Reeves et al., 2013]. В настоящее время известны некоторые случаи перекрестной лекарственной устойчивости, в том числе рифампцин-рифамбутин [Chikamatsu et al., 2009], клофазимин-бедаквилин [Hartkoorn et al., 2014].

Имеющиеся на сегодняшний момент данные о функционировании продуктов генов резистоста, генов систем токсин-антитоксин являются не полными и требуют глубоких исследований, в том числе проведенных в настоящей работе.

Цель работы: Изучить роль генов резистоста, в частности генов регулона WhiB7, в формировании лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*.

Задачи:

1. Провести биоинформатический поиск мутаций генов резистоста (*whiB-like*, *aph*, *aac*, гены регулона WhiB7, гены клеточных транспортеров), как в геномах штаммов *M. tuberculosis*, доступных в GenBank NCBI, так и в геномах клинических изолятов *M. tuberculosis*. Для этого:
 - а. Составить каталог генов природной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*;
 - б. Провести поиск мутаций в генах резистоста, в том числе регулона WhiB7;
 - в. Определить корреляцию между мутациями в генах резистоста и линией или фенотипом лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*;
 - г. Провести поиск мутаций в генах регулона WhiB7 в геномах клинических изолятов *M. tuberculosis* путем секвенирования и анализа как отдельных генов, так и геномов *M. tuberculosis*;
 - д. Провести биоинформатический анализ влияния мутаций в генах на функциональную активность кодируемых ими белков и провести отбор аллельных вариантов генов регулона WhiB7 для дальнейшего проведения функционального анализа белков.

2. Изучить функциональную активность аллельных вариантов генов регулона *WhiB7 M. tuberculosis* и их роль в возникновении природной лекарственной устойчивости. Для этого:
 - а. Провести поиск гомологов регулона *WhiB7 M. tuberculosis* у *M. smegmatis*;
 - б. Провести функциональный анализ влияния генов регулона *WhiB7* и их отобранных мутантных вариантов на уровень лекарственной устойчивости.
3. Составить схему перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis mc² 155*. Для этого:
 - а. Провести анализ возникновения перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis mc² 155*;
 - б. Провести отбор генов-кандидатов, потенциально определяющих выявленный тип перекрестной устойчивости;
 - в. Провести транскрипционный анализ выбранных генов-кандидатов.

Научная новизна. По результатам выполнения диссертационной работы впервые был составлен каталог генов природной лекарственной устойчивости, включающий в себя аллельные варианты генов резиста, среди более чем 1700 секвенированных геномов *M. tuberculosis*. Впервые была изучена роль генов *whiB7*, *tap* и *Rv1473* и их аллельных вариантов в осуществлении природной лекарственной устойчивости. Впервые был проведен анализ индукции антибиотиками различных классов перекрестной лекарственной устойчивости, а также транскрипционный анализ генов (глобальных регуляторов транскрипции), предположительно участвующих в реализации перекрестной лекарственной устойчивости. Впервые был установлен уровень изменения экспрессии генов модуля TA II типа *varBC2* у *M. smegmatis mc² 155* в присутствии аминогликозидных антибиотиков, а также офлоксацина.

Практическая значимость. Результаты, полученные в данной работе, проясняют механизм возникновения повышенного уровня лекарственной устойчивости как у людей, больных туберкулезом, так и людей, попадающих в группу риска (пациенты, ранее прошедшие курс лечения туберкулеза, заключенные, мигранты, лица, подвергающиеся близкому контакту с больными туберкулезом, и т.п.).

Также результаты, полученные в данной работе, демонстрируют необходимость контроля использования антибиотиков в сельском хозяйстве. Согласно правилам технического регламента на молоко и молочную продукцию (ФЗ от 12 июня 2008 г. N 88-ФЗ), концентрация стрептомицина не должна превышать 0,5 мкг/мл. Однако данные анализа перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis mc² 155*, модельного организма для изучения *M. tuberculosis*, показали индукцию транскрипции генов резиста уже при 0,02 мкг/мл. Таким образом, попадание использованных в животноводстве антибиотиков (стрептомицина) через молоко в организм человека может приводить к изменениям в уровне лекарственной устойчивости возбудителя у больных или инфицированных людей. Данный факт свидетельствует о необходимости пересмотра существующих регламентов.

Все это является исключительно важным как в рамках здравоохранения и социальной сферы (в виде сокращения связанных с болезнью социальных выплат, затрат на лекарственные препараты и пребывание в условиях стационара, снижения иных расходов, связанных с терапией туберкулеза), так и в сфере экономики (посредством увеличения производительности труда и снижения рисков появления нетрудоспособности).

Положения, выносимые на защиту:

1. Транскрипционный активатор *WhiB7 M. tuberculosis* регулирует лекарственную устойчивость *M. smegmatis mc² 155* к β -лактамам, а также является медиатором перекрестной лекарственной устойчивости;

2. Клеточный транспортер Tap *M. tuberculosis* участвует в обеспечении лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc² 155 к антибиотикам классов макролидов и фторхинолонов, а клеточный транспортер Rv1473 - к аминогликозидам и фторхинолонам;
3. Стрептомицин, канамицин, офлоксацин и тетрациклин в концентрациях, не влияющих на скорость роста клеток *M. smegmatis* mc² 155, являются индукторами природной перекрестной лекарственной устойчивости;
4. Офлоксацин является индуктором перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc² 155 к аминогликозидным и β-лактамным антибиотикам.

Степень достоверности и апробация результатов. Автором опубликовано 5 статей по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: на 38м конгрессе Федерации Европейских Биохимических Сообществ (38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, июль 2013 г.), на II конгрессе национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, ноябрь 2013 г.) Саммите по туберкулезу 2015 (The 2015 TB Summit, Лондон, март 2015 г.) и на Научно-практической конференции по медицинской микологии (XIX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, июнь, 2016 г.). Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2013-2017 гг.

Личный вклад автора в исследование. Автором лично выполнена подавляющая часть работы, а именно: выделение ДНК, конструирование праймеров, проведение ПЦР, электрофореза в агарозном геле, подготовка проб для секвенирования и анализ нуклеотидных последовательностей, генотипирование, мутагенез гена *whiB7* и клонирование исследуемых генов в составе экспрессионных векторов, выделение РНК, транскрипционный анализ и вся микробиологическая работа с непатогенными *E. coli* и *M. smegmatis*.

Эксперименты по проведению полногеномного секвенирования, сполиготипированию, а также часть биоинформатического анализа проводились совместно с сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН.

Выделение ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*, использованной для секвенирования целевых генов и полногеномного секвенирования, осуществлялось в Центральном НИИ Туберкулеза, Москва, под руководством проф. д.б.н. Л. Н. Черноусовой; УНИИФ Минздрава РФ, Екатеринбург, под руководством проф. д.м.н. С. Н. Скорнякова и к.б.н. М. А. Кравченко; ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, под руководством проф. д.м.н. О.Б. Огаркова.

Автор лично проводил анализ полученных результатов и оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании статей по результатам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, двух глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, словаря терминов, списка цитируемой литературы, приложения и благодарностей. Работа изложена на 187 страницах машинописного текста, включает 18 таблиц и 37 рисунков. Список используемой литературы содержит 263 публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Первые две главы диссертационной работы посвящены обзору литературы. Первая глава описывает заболевание - туберкулез, методы его диагностики и существующие методы лечения в связи с приобретенной лекарственной устойчивостью возбудителя туберкулеза. Вторая глава литературного обзора описывает систему природной лекарственной устойчивости (резистоста) *M. tuberculosis* и в частности, гены регулона WhiB7.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. В работе использовались штаммы *Escherichia coli* (DH5 α) и штамм *M. smegmatis* mc² 155.

Для культивирования штамма *E. coli* использовали среду LB (Amresco, США), а для *M. smegmatis* – среду Lemco-Tw (5 г/л Lemco Powder, 5 г/л NaCl, 5 г/л бакто-пептона, 0,05% Tween-80). Культивирование бактерий в жидкой среде проводили при 37°C и 250 об/мин. Твердые среды содержали 2,0% агара. В качестве среды для тестирования лекарственной устойчивости использовали M290 (триптон-соевый агар, HiMedia, Индия).

ДНК, использованная в работе. В работе была использована ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*, предоставленная:

1. ФГБУН Центральный исследовательский институт туберкулеза, «ЦНИИТ», Москва, Россия;
2. Уральским НИИ фтизиопульмонологии, Екатеринбург, Россия;
3. ФГБУН научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия.

Выделение РНК. РНК выделяли из бактериальной культуры *M. smegmatis*, с использованием Trizol (Invitrogen, США) и очищали водонасыщенным фенолом (рН = 4,5-5) с хлороформ/изоамиловым спиртом в соотношении 25:24:1.

Анализ качества выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле, анализ количества - с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

Удаление контаминирующей геномной ДНК проводили согласно рекомендациям производителя с использованием TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, США).

Проведение реакции обратной транскрипции. Реакцию синтеза кДНК с цепи РНК проводили с использованием коммерческого набора «iScript Select cDNA Synthesis kit» (BioRad, США) согласно инструкциям производителя.

Плазмидные векторы. В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и гетерологической экспрессии генов в *M. smegmatis* использовали челночный вектор рMIND:Km-.

Олигонуклеотиды. Синтез олигонуклеотидов проводили в компаниях «Синтол» и «Евроген» (Москва). Олигонуклеотиды для клонирования подбирали вручную при помощи программы Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.), для секвенирования клонированных фрагментов в плазмиде и проведения количественной ПЦР в реальном времени – Primer BLAST NCBI.

Манипуляции с ДНК. Выделение плазмид проводили наборами GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, США) либо QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN, ФРГ) из культуры *E. coli* объемом до 10 мл, либо набором QIAGEN Plasmid Midi Kit Plus (QIAGEN,

ФРГ) из культуры объемом до 50 мл. Выделение фрагмента ДНК из 1% агарозного геля проводили с помощью наборов GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, США) либо QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, ФРГ). Очистку ДНК из реакционной смеси (после амплификации, рестрикции либо лигирования) проводили наборами GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США) либо QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, ФРГ).

Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием наборов High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific, США) на приборе T100 (Bio-Rad, США). Реакцию амплификации ДНК в режиме реального времени проводили с использованием коммерческих наборов «iTaq Universal SYBR Green Supermix» на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Рестрикцию целевых образцов ДНК проводили с использованием эндонуклеаз серии FastDigest фирмы “Fermentas”. Для проведения реакции лигирования использовали T4 ДНК лигазу фирмы “Fermentas”. Для анализа длины и количества фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле (агароза “Amresco”, США) в электродном буфере TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6). В качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК фага λ (*EcoRI/HindIII*) (ThermoFischer Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler (ThermoFischer Scientific, США). Сайт-направленный мутагенез проводили по методу точковых мутаций Нельсона.

Расчет уровня экспрессии, температур плавления, нормирование уровней экспрессии исследуемых генов на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства sigA и polA проводился с использованием коммерческой программы «Bio-Rad CFX Manager 3.1» (Bio-Rad, США). Анализ относительного уровня экспрессии проведен в трех независимых повторах.

Пиросеквенирование ДНК *M. tuberculosis*. Для проведения секвенирования геномов *M. tuberculosis* использован секвенатор 454 GS Junior (Roche, Швейцария), наборы Rapid Library для подготовки библиотеки ДНК; секвенирование фрагментных библиотек проводили с реактивами Titanium (Roche, Швейцария); сборка отдельных прочтений фрагментов ДНК в контиги проводилась с помощью программного обеспечения 454 GS De Novo Assembler версии 3.0 (с параметрами по умолчанию). При секвенировании было обеспечено в среднем 16-кратное покрытие.

Количественная оценка ДНК, РНК. Ориентировочную количественную оценку ДНК проводили по электрофореграмме. Для более точного определения использовался флуоресцентный метод измерения на приборе Qubit (ThermoFischer Scientific, США) по протоколу производителя с наборами Qubit dsDNA BR Kit и Qubit dsDNA HS Kit (ThermoFischer Scientific, США). Для количественной оценки РНК использовали набор Qubit RNA BR Kit (ThermoFischer Scientific, США).

Генотипирование клинических изолятов *M. tuberculosis*. Генотипирование клинических изолятов проводили методом MIRU-VNTR по 24 локусам согласно стандартному протоколу, интерпретацию результатов проводили с использованием веб-приложения MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>). Генотипирование с использованием метода спוליготипирования производили по стандартному протоколу. Определение спוליготипа проводили по базе данных SpolDB4.

Трансформация бактериальных клеток. Компетентные клетки *E. coli* получали кальциевым методом (0,1 М раствор CaCl₂). Клетки *M. smegmatis* трансформировали методом электропорации в 10% растворе глицерина.

Подбор концентраций антибиотиков. Поиск концентраций антибиотиков для индукции экспрессии генов резистоста был проведен с использованием культуры *M. smegmatis* mc² 155 в жидкой среде. Анализировали только ту концентрацию антибиотика (стрептомицина,

канамицина, офлоксацина, тетрациклина, эритромицина), в которой оптическая плотность OD₆₀₀ после 18 часов инкубации культуры *M. smegmatis* mc² 155 в жидкой среде, содержащей антибиотик, не отличалась от OD₆₀₀ культуры *M. smegmatis* mc² 155 без антибиотика.

Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Эксперимент проведен в трех независимых повторах.

Оценка уровня лекарственной чувствительности.

Метод бумажных дисков. Культуру *M. smegmatis*, выращивали в жидкой среде до достижения OD₆₀₀=1,2, после чего разводили в соотношении 1:9:10 (культура:вода:среда M290) и заливали верхним слоем по 5 мл на чашки Петри с агаризованой средой M290 в качестве нижнего слоя. В среду добавляли селективный антибиотик гигромицин С до конечной концентрации 50 мкг/мл, а также, при необходимости, тетрациклин для индукции (20 нг/мл).

После высыхания чашек с культурой на них производилось наложение бумажных дисков с исследуемым антибиотиком. Чашки инкубировали при 37°C до появления газона, после чего производили измерение диаметров зон ингибирования роста культуры.

Определение МИК. Для поиска минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков в отношении *M. smegmatis* использовали метод серийных двукратных разведений антибиотиков в жидкой среде. Оценку роста или его отсутствия проводили визуально и подтверждали спектрофотометрически через 2-3 дня инкубации при 37°C.

Биоинформатические методы. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности генов и их продуктов получены из GenBank NCBI. Гомологию аминокислотной последовательности белков исследовали в программе BLAST. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega. Для построения филогенетических древ использовали программу Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) версии 7.00. Древа строили по методу присоединения соседей (neighbor-joining). Диаграммы Эйлера-Венна строили с использованием ресурса <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

Так как переменные, по которым необходимо было статистически оценить силу связи, являются дихотомическими (интервальная шкала), корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Пирсона в программе Microsoft Excel. Для анализа разброса значений выборки было использовано среднее квадратическое отклонение, σ . Столчатые диаграммы строились на основе средних значений диаметров зон ингибирования роста культур клеток *M. smegmatis* mc² 155.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформатический анализ генов регулона WhiB7 и других основных групп генов природной лекарственной устойчивости. Природная лекарственная устойчивость является неотъемлемым атрибутом всех бактерий, в особенности почвенных и патогенных. Объектом исследования является резистом *M. tuberculosis*, в частности система транскрипционного фактора WhiB7.

В связи со сложностью и длительностью проведения генетических исследований на возбудителе туберкулеза *M. tuberculosis*, в работе был использован модельный организм - *M. smegmatis* mc² 155, который подходит для проведения целого ряда генетических, молекулярно-биологических и микробиологических исследований. Общим для *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* является: 1) одинаковое строение клеточной стенки и ее проницаемость, 2) одинаковый клеточный ответ при гипоксии [Dick et al., 1998; Mayuri et al., 2002], 3) способность к аэробному окислению оксида углерода, 4) наличие более чем 2000 гомологичных генов [King, 2003]. Кроме того, *M. smegmatis* используется для проведения первичного скрининга противотуберкулезных препаратов [Cooper, 2013].

Таким образом, сравнительный геномный анализ показал, что *M. smegmatis* mc² 155 может служить модельным организмом для изучения некоторых генов резистама *M. tuberculosis*, например генов регулона WhiB7 и не может быть использован для исследования генов APH и некоторых транспортеров. В дальнейшем каталог генов был использован в качестве базы для проведения поиска мутантов *M. tuberculosis* по выбранным генам.

Определение связи между мутациями в генах природной лекарственной устойчивости и генотипом *M. tuberculosis*. Изоляты микобактерий туберкулеза подразделяются на группы по происхождению и различаются фенотипически. Для идентификации изолятов используются несколько различных методик, а именно: MIRU-VNTR, сполитипирование, типирование, основанное на мутациях в генах семейства токсин-антитоксин, и другие. Для получения полной картины полиморфизма генов резистама *M. tuberculosis* была создана выборка доступных для анализа геномов *M. tuberculosis* в размере 1740 штук (база данных GenBank NCBI).

Для проведения статистического анализа связи между мутациями в генах регулона WhiB7 и генотипической характеристикой штаммов был проведен корреляционный анализ между наличием определенной мутации в гене резистама и генотипом штамма *M. tuberculosis*.

Корреляционный анализ мутаций генов WhiB7-регулона и принадлежности к определенной линии в исследуемой выборке показал значимую статистическую связь только для двух аллелей генов регулона WhiB7: *whiB7* и *tap*, Таблица 2.

Таблица 2. Мутации, ассоциированные с различными филогенетическими группами

Ген	Мутация	Линия <i>M. tuberculosis</i>	Коэффициент корреляции, <i>r</i>	95% доверительный интервал*
<i>whiB7</i>	delG191	EAI-Manila	0,92	0,91-0,93
<i>tap</i>	InsC581	Beijing	0,81	0,79-0,82
<i>tap</i>	T(504)A	EAI	0,22	0,18-0,27
<i>tap</i>	G(838)C	EAI	0,29	0,25-0,33
<i>tap</i>	T(1029)C	EAI-Manila	0,97	0,97-0,98
<i>tap</i>	T(528)C	Haarlem	0,28	0,24-0,32

* p-value<0.001

Поиск функционально-значимых мутаций позволил выявить только одну мутацию, потенциально способную влиять на функциональную активность WhiB7 – делеция в позиции G191. Делеция приводит к сдвигу рамки считывания непосредственно перед А/Т-«крючком» (белковый домен WhiB7, необходимый для связывания с ДНК) и свойственна представителям линии EAI-Manila.

Среди 1740 последовательностей гена *tap* наиболее часто встречающимся аллельным вариантом является *tap(insC₅₈₁)*. Данная мутация может быть филогенетическим маркером для разделения изолятов на сублинии внутри кластера Beijing, а также маркером микроэволюции природной лекарственной устойчивости: 19.4% геномов несет мутацию C₅₈₁ в группе Beijing-ancestral и 100% - в более молодых группах Beijing-modern и B0/W148.

Частоты обнаружения других мутаций не имели статистически значимой связи с определенными линиями *M. tuberculosis*, в том числе в двух других генах регулона WhiB7 – *eis* и *erm37*.

Поиск мутаций генов регулона WhiB7 у клинических изолятов *M. tuberculosis*. Для поиска связи обнаруженных аллельных вариантов генов с принадлежностью к определенным филогенетическим линиям нами была использована коллекция ДНК клинических изолятов

M. tuberculosis, выделенная в ЦНИИ Туберкулеза (<http://critub.ru/>), представляющая собой выборку изолятов, характеризующихся различным спектром лекарственной устойчивости и анамнезом пациента-источника. Коллекция состоит из 64 образцов ДНК *M. tuberculosis*, разделенных на две группы (Таблица 3).

Таблица 3. Коллекция клинических изолятов *M. tuberculosis*

Группа	Количество изолятов	Лекарственная устойчивость		
		Моно- и полирезистентные	МЛУ	ШЛУ
А	41	6	25	10
Б	23	-	-	-
Всего	64	6	25	10

Группа А включала 41 изолят лекарственно устойчивых штаммов, группа Б – 23 изолята, выделенные от пациентов с определенной лекарственной чувствительностью ко всем исследуемым препаратам.

Была определена филогенетическая принадлежность каждого из образцов к определённой линии методом сполиготипирования по 43 спейсерам: 69,7% изолятов принадлежат к группе Beijing, 12,5% - к группе T1 и 4,69% - к T2, 6,29% - к группе LAM9, 4,64% - к группе H4 и около 3% не определены. Также в результате сполиготипирования обнаружены два ранее неизвестных сполиготипа.

Для уточнения результатов было проведено генотипирование клинических изолятов с использованием метода MIRU-VNTR по 24 локусам, обладающим большей дискриминирующей способностью.

Итоговое распределение изолятов *M. tuberculosis* по профилю MIRU-VNTR было следующим: 71,4% изолятов относится к группе Beijing, 9,5% - к LAM, 3% - к S и Cameroon, 3,17% - к URAL и для 11% изолятов не удалось определить принадлежность.

Анализ полученных данных показал, что на территории центрального региона РФ преобладают штаммы *M. tuberculosis* линии Beijing, что соответствует эпидемиологическим данным этого региона. Также методом MIRU-VNTR установлено наличие более редких линий: S и Cameroon.

Далее был проведен поиск аллельных вариантов генов *whiB7* и *tap*. В дополнение к ним для дальнейшего анализа был выбран ген клеточного транспортера *rv1473*, являющийся наименее изученным геном регулона WhiB7.

Необходимостью этого этапа было обнаружение редких мутаций в данных генах с фокусом на редкие линии *M. tuberculosis*, а также анализ распределения мутаций, характерных группе Beijing в случайной выборке клинических изолятов и среди секвенированных геномов *M. tuberculosis* GenBank NCBI, а также поиск полиморфных вариантов гена *rv1473*. В результате получены данные, представленные в Таблице 4.

Таблица 4. Мутации в генах регулона WhiB7

Группа	Количество изолятов, шт.	Мутации в гене <i>whiB7</i> , шт.	Мутации в гене <i>tap</i> , шт.	Мутация в гене <i>Rv1473</i> , шт.
А	41	-	32	2
Б	23	-	14	1

В коллекции клинических изолятов нами обнаружены мутации в генах *tap* – insC581 и *Rv1473* (C422T, insC₃₅₀, insG₃₂₀). Для итогового анализа использованы следующие аллельные варианты генов: *whiB7*ΔG₁₉₁, *tap*(insC₅₈₁) и *Rv1473* (C422T) (мутация в гене приводит к аминокислотной замене A141V).

Сравнительный геномный анализ клинических изолятов *M. tuberculosis*. Другой выборкой для поиска и анализа мутаций генов резистома, в частности генов регулона WhiB7, стала коллекция клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов из различных регионов России. В работе использовались 7 изолятов *M. tuberculosis*, охарактеризованных по фенотипу лекарственной устойчивости, Таблица 5.

Таблица 5. Секвенированные геномы *M. tuberculosis*

Геном <i>M. tuberculosis</i> /номер GenBank NCBI	Фенотип устойчивости к противотуберкулезным препаратам	Генотип	Место выделения
E186Hv/PRJNA271051	H, R, E, Z, Of	Beijing-B0/W148	Екатеринбург
13-2459/PRJNA282588	H, R, E, Z, Et, A, Cp	Beijing-B0/W148	Москва
13-4152/PRJNA280727	H, R, Z, Et, A, Cp	Beijing-B0/W148	Москва
B9741/PRJNA315211	H, R, S, E, Z	Beijing-B0/W148	Иркутск
EKB_8/PRJNA361210	H, R	Beijing-modern	Екатеринбург
13-3935/PRJNA268716	Чувствительный	LAM	Москва
T11555/PRJNA361211	H, R, S, E, Et, K, PAS, A, Cp, Of	LAM	Иркутск

H - изониазид; R - рифампицин; E - этамбутол; Z - пиразинамид; Of - офлоксацин; Et - этионамид; A - амикацин; Cp - капреомицин; S - стрептомицин; PAS - парааминосалициловая кислота; K – канамицин.

Геномы, приведенные в Таблице 5, были секвенированы для поиска ранее неописанных мутаций в генах природной лекарственной устойчивости и проведения сравнительного геномного анализа. В результате секвенирования была составлена диаграмма сходства и различия обнаруженных мутаций, Рисунок 2.

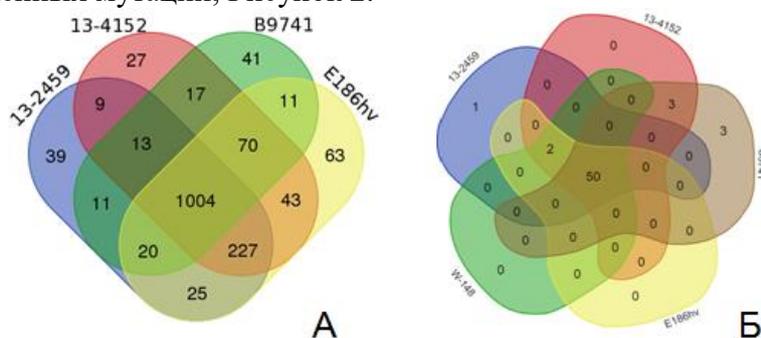


Рисунок 2. Диаграмма Эйлера-Венна для 4х (А) и 5и (Б) множеств SNPs секвенированных геномов *M. tuberculosis* филогенетической линии Beijing-B0/W148. *M. tuberculosis* E186hv, *M. tuberculosis* 13-2459, *M. tuberculosis* 13-4152, *M. tuberculosis* B9741 и *M. tuberculosis* W148.

Как следует из диаграммы, представленной на Рисунке 2 (А), все геномы *M. tuberculosis* филогенетической линии Beijing-B0/W148: B9741, 13-2459, 13-4152, E186hv имеют количество уникальных мутаций в диапазоне от 27 до 63, при общем количестве идентичных мутаций, равном 1004.

Для более детального анализа распределения мутаций в геномах Beijing-B0/W148 были использованы определенные наборы генов: белков клеточной стенки, липопротеинов, метаболизма жирных кислот, синтеза миколовых кислот, катаболизма холестерина, белков-ингибиторов антимикробного ответа макрофага, сигма факторов, двухкомпонентных систем, систем ТА, СТПК, систем секреции VII типа (ESX VII), протеаз, белков клеточного транспорта, генов регулона WhiB7 и др. (315 генов).

В результате была построена диаграмма распределения несинонимичных мутаций, представленная на Рисунке 2 (Б). В качестве референсной последовательности была использована ДНК *M. tuberculosis* W148.

Показано, что филогенетическая группа Beijing-B0/W148 является достаточно однородной по характеристикам природной лекарственной устойчивости, вирулентности и толерантности. Исключение составляет геном B9741, имеющий три мутации в гене *mceIF* - одном из генов вирулентности микобактерий, и в гене двухкомпонентной сигнальной трансдуцирующей системы *phoPR – phoR*, участвующей в вирулентности и патогенезе у *M. tuberculosis*.

Клонирование генов регулона *WhiB7* в *M. smegmatis*. Для исследования влияния на уровень лекарственной устойчивости продукта гена *whiB7*, а также его аллельного варианта методом сайт-направленного мутагенеза был создан ген *whiB7*, несущий делецию G (гуанин) в позиции 191. Все гены *M.tuberculosis* H37Rv и их аллельные варианты были клонированы в вектор pMIND:Km- (Таблица 6).

Таблица 6. Генетические конструкции, использованные в работе

Генетическая конструкция	Рекомбинантный ген	Предполагаемый фенотип
pMINDKm-	-	<i>w.t.</i> (дикий тип)
pMWB7	<i>whiB7</i>	Возникновение лекарственной устойчивости
pMWB7M	<i>whiB7</i> ΔG ₁₉₁	Возврат к <i>w.t.</i>
pMTAP	<i>tap</i>	Возникновение лекарственной устойчивости
pMTAPM	<i>tap</i> (insC ₅₈₁)	Возврат к <i>w.t.</i>
pMRV	<i>Rv1473</i>	Возникновение лекарственной устойчивости
pMRVM	<i>rv1473</i> (C422T)	Изменение/отсутствие изменения лекарственной устойчивости

Влияние сверхэкспрессии генов *whiB7*, *tap* и *rv1473* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis*. Для оценки влияния сверхэкспрессии генов регулона *WhiB7* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis* были использованы антибиотики 8 различных химических классов (33 антибиотика). На Рисунке 3 показано изменение уровня лекарственной чувствительности клеток *M. smegmatis*, содержащих векторы с рекомбинантными генами, при сверхэкспрессии исследуемых генов.

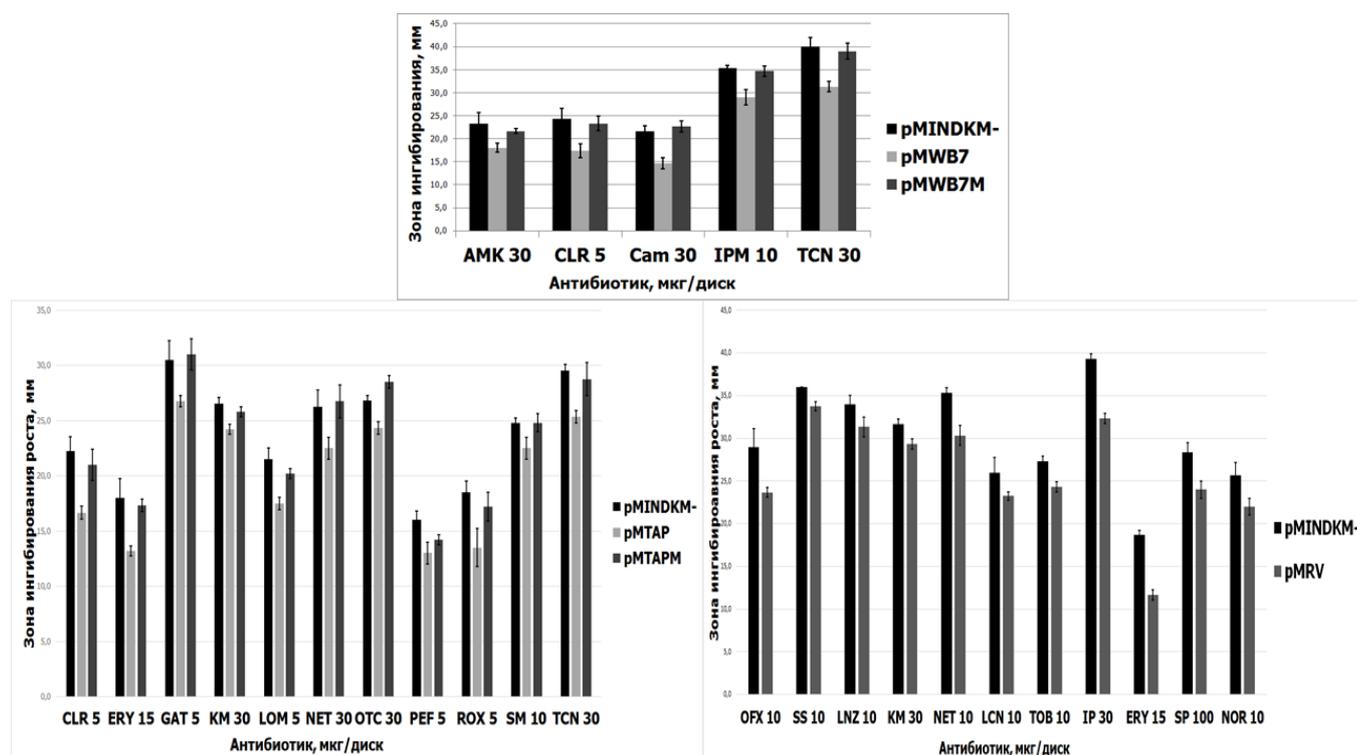


Рисунок 3. Влияние сверхэкспрессии генов *whiB7*, *tap* и *rv1473* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis*. Сравнение проведено дисковым методом, измерены диаметры зон ингибирования роста культуры. Планки погрешности – стандартное отклонение. AMK – амикацин; CLR – кларитромицин; Cam - хлорамфеникол; IPM - имипенем; TCN - тетрациклин; IP - изепамицин; ERY - эритромицин; GAT - гатифлоксацин; KM - канамицин; LOM - ломефлоксацин; NET - нетилмицин; OTC - окситетрациклин; PEF - пefлоксацин; ROX - рокситромицин; SM - стрептомицин; OFX - офлоксацин; SS - сизомицин; LNZ - линезолид; LCN - линкомицин; TOB - тобрамицин; SP - спирамицин; NOR - норфлоксацин.

Сравнительный анализ зон ингибирования роста культур *M. smegmatis*, содержащих pMWB7 и pMWB7M, показал увеличение уровня лекарственной устойчивости культуры, содержащей ген *whiB7*, к амикацину (аминогликозиды), кларитромицину (макролиды), хлорамфениколу, тетрациклину и имипенему (β -лактамы). Снижение лекарственной чувствительности к имипенему впервые показывает участие транскрипционного фактора WhiB7 в осуществлении лекарственной устойчивости к β -лактамному антибиотику. Снижение лекарственной устойчивости культуры, содержащей *whiB7* Δ G₁₉₁, относительно культуры с *whiB7*, подтверждает возврат к фенотипу *w.t.*

Сравнительный анализ уровня лекарственной чувствительности клеток трансформантов *M. smegmatis* показал, что Tap обеспечивает лекарственную устойчивость к аминогликозидам (стрептомицину, канамицину, нетилмицину) и тетрациклинам (окситетрациклину, тетрациклину). Однако помимо ранее описанного фенотипа устойчивости показано участие гена *tap* в обеспечении устойчивости к антибиотикам класса фторхинолонов (гatifлоксацину, ломефлоксацину, пefфлоксацину) и макролидов (кларитромицину, рокситромицину, эритромицину). Уровень лекарственной устойчивости культуры, содержащей *tap*(insC₅₈₁), соответствовал уровню контроля (вектор без вставки), что подтверждает отсутствие активности транспортера при экспрессии *tap*(insC₅₈₁).

В связи с тем, что на сегодняшний момент точная функция, как и структура белка Rv1473 не известны, проведено исследование фенотипа лекарственной чувствительности трансформантов *M. smegmatis* pMRV. Тест с бумажными дисками показал увеличение уровня лекарственной устойчивости *M. smegmatis* pMRV к антибиотикам группы фторхинолонов (офлоксацину, спарфлоксацину, норфлоксацину), аминогликозидам (сизомицину, канамицину, нетилмицину, тобрамицину, изепамицину), макролидам (эритромицину, спирамицину), а также к азилидам (линкозамиду) и линкомицину – синтетическому антибиотику.

Таким образом, природная лекарственная устойчивость, определяемая генами WhiB7 регулона, является разносторонней и, возможно, перекрестной, то есть может возникать в ответ на действие антибиотиком и далее индуцировать экспрессию WhiB7 и генов регулона. Тем самым, данная система является жизненно важной и позволяет *M. tuberculosis* адаптироваться к условиям стресса, возникающего вследствие действия антибиотиков.

Исследование явления перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc² 155.

Полученные результаты показали, что WhiB7 как транскрипционный фактор способен регулировать лекарственную устойчивость *M. smegmatis*. Однако ранее описанные функции WhiB7 включают не весь спектр лекарственной устойчивости, определяемый этим транскрипционным фактором. В частности, не известен механизм устойчивости к фениколам и β -лактамным антибиотикам. Тип устойчивости к антибиотикам, определяемый WhiB7, является классическим для перекрестной лекарственной устойчивости. Основываясь на этом факте, а также на данных определения лекарственной чувствительности трансформантов *M. smegmatis*, было проведено исследование явления перекрестной лекарственной устойчивости клеток *M. smegmatis* и проведен транскрипционный анализ генов, потенциально вовлеченных в реализацию перекрестной устойчивости.

Принципы и методика изучения индукции перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* к антибиотикам. Для проведения исследования по изучению возникновения перекрестной лекарственной устойчивости были определены концентрации антибиотиков, не влияющие на динамику роста культуры клеток *M. smegmatis*.

В качестве индукторов (антибиотиков) были выбраны: стрептомицин (0,02 мкг/мл), канамицин (0,03 мкг/мл), эритромицин (0,2 мкг/мл), офлоксацин (0,2 мкг/мл) и тетрациклин (0,02 мкг/мл). Данные антибиотики относятся к различным химическим классам веществ,

используемых для антимикробной, в том числе противотуберкулезной терапии, и являются базовыми в своих химических классах.

Оценка уровня индукции перекрестной лекарственной устойчивости, осуществляемой канамицином, стрептомицином и офлоксацином. Антибиотики в подобранных концентрациях были использованы для исследования индукции перекрестной лекарственной устойчивости.

Уровень чувствительности к 33 антибиотикам определяли методом бумажных дисков. В качестве контроля использовали культуру, выращенную в среде без добавления антибиотиков. На Рисунке 4 представлены результаты значимых изменений уровня лекарственной чувствительности клеток *M. smegmatis* mc² 155 после воздействия на них канамицином, стрептомицином и офлоксацином.

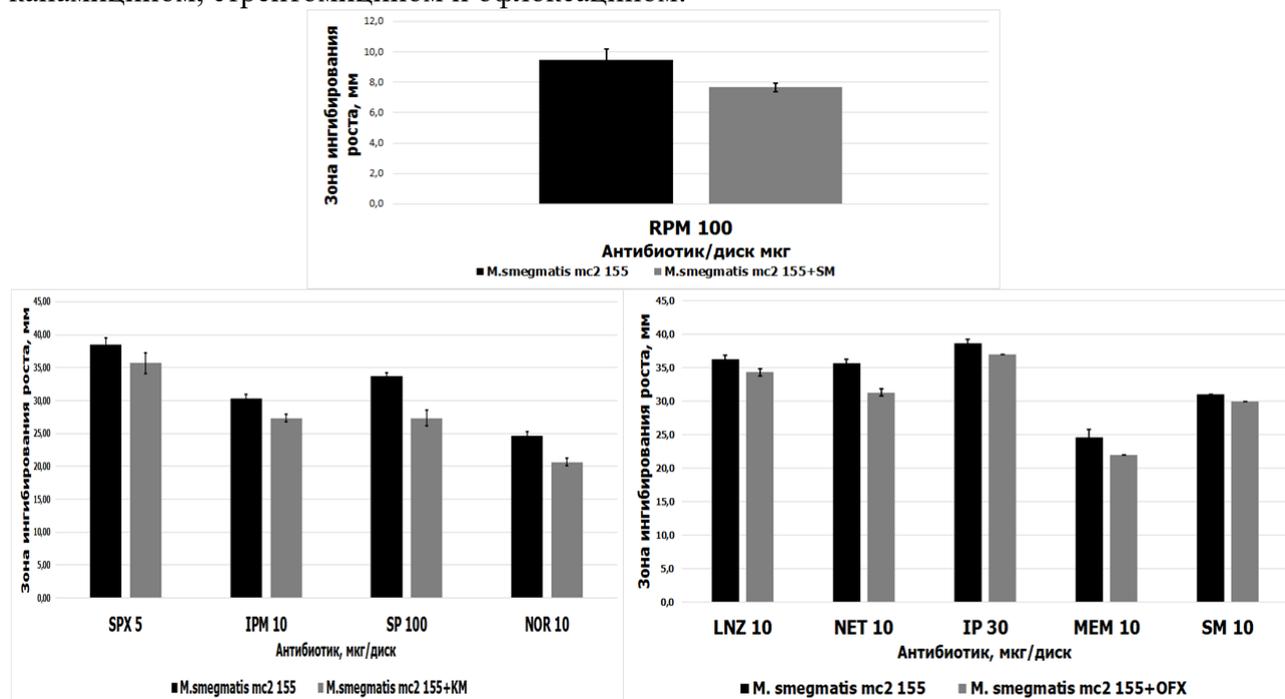


Рисунок 4. Изменение уровня чувствительности *M. smegmatis* при воздействии канамицином, стрептомицином и офлоксацином. Сравнение проведено дисковым методом, измерены диаметры зон ингибирования роста культуры. Планки погрешности отражают стандартное отклонение. RPM –рифампицин; SPX - спарфлоксацин; IPM - имипенем; SP - спирамицин; NOR - норфлоксацин; LNZ - линезолид; NET - нетилмицин; IP - изепамицин; MEM - меропенем; SM - стрептомицин.

Как следует из данных, представленных на Рисунке 4, под действием на культуру клеток *M. smegmatis* канамицина достоверно снижался диаметр зон ингибирования роста культуры *M. smegmatis* вокруг дисков с спарфлоксацином и норфлоксацином, имипенемом, а также с спирамицином. Для других исследуемых антибиотиков значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

Стрептомицин является достоверным индуктором лекарственной устойчивости культуры *M. smegmatis* к рифампицину. Для других исследуемых антибиотиков значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

Офлоксацин является индуктором лекарственной устойчивости к β-лактамному антибиотику, азалидам и аминогликозидам. Для других исследуемых антибиотиков значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

При воздействии на культуру клеток *M. smegmatis* индуктором – тетрациклином – наблюдался рост уровня лекарственной устойчивости культуры к фторхинолонам, азалидам, макролидам, аминогликозидам, β-лактамным и тетрациклинам.

Таким образом, антибиотики класса аминогликозидов, фторхинолонов и тетрациклинов приводят к развитию перекрестной лекарственной устойчивости культуры *M. smegmatis*.

Отбор генов-кандидатов, потенциально определяющих выявленный тип перекрестной устойчивости. В связи с тем, что развитие перекрестной лекарственной устойчивости в значительной степени определяется действием различных транскрипционных факторов, нами был проведен поиск генов, потенциально вовлеченных в осуществление перекрестной лекарственной устойчивости и антибиотикотолерантности у *M. smegmatis*. Составленный набор включает 11 генов транскрипционных факторов (*whiB7*, *napM*, *ltmA*, *tetR*, *rbpA*, *mtrA*, *mfpB*, *lfrR*, *marR*, *araC*, *blaS*) и четырех модулей токсин-антитоксин II типа (*mazEF*, *phd/doc*, *vapBC30*, *vapBC2*), регулирующих толерантность к антибиотикам. Данный механизм опосредован протеазо-зависимой саморегулирующейся экспрессией генов системы ТА. Более того, все 11 генов транскрипционных факторов имеют функциональные ортологи в составе генома *M. tuberculosis*.

Для оценки участия этих генов в перекрестной лекарственной устойчивости был проведен их транскрипционный анализ в условиях индукции стрептомицином, офлоксацином и канамицином.

Исследование экспрессии генов природной перекрестной лекарственной устойчивости и толерантности *M. smegmatis*. Анализ относительного, нормализованного на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства *sigA* и *polA*, уровня экспрессии исследуемых генов проведен с использованием метода количественной ПЦР в режиме реального времени. Значимым считалось изменение в уровне экспрессии более 2х раз.

Таблица 7. Изменение уровня экспрессии исследуемых генов и систем генов под действием низких концентраций антибиотиков

Антибиотик	Повышение уровня транскрипции (раз)	Снижение уровня транскрипции (раз)*
Канамицин	<i>whiB7</i> (13,2)	X
	<i>phd/doc</i> (2,8)	
	<i>vapBC2</i> (9,6)	
Офлоксацин	<i>whiB7</i> (2,4)	<i>napM</i> (27)
	<i>vapBC2</i> (5,95)	<i>tetR</i> (4,88)
	X	<i>araC</i> (2,67)
		<i>ltmA</i> (3,17)
		<i>marR</i> (2,39)
		<i>mtrA</i> (2,12)

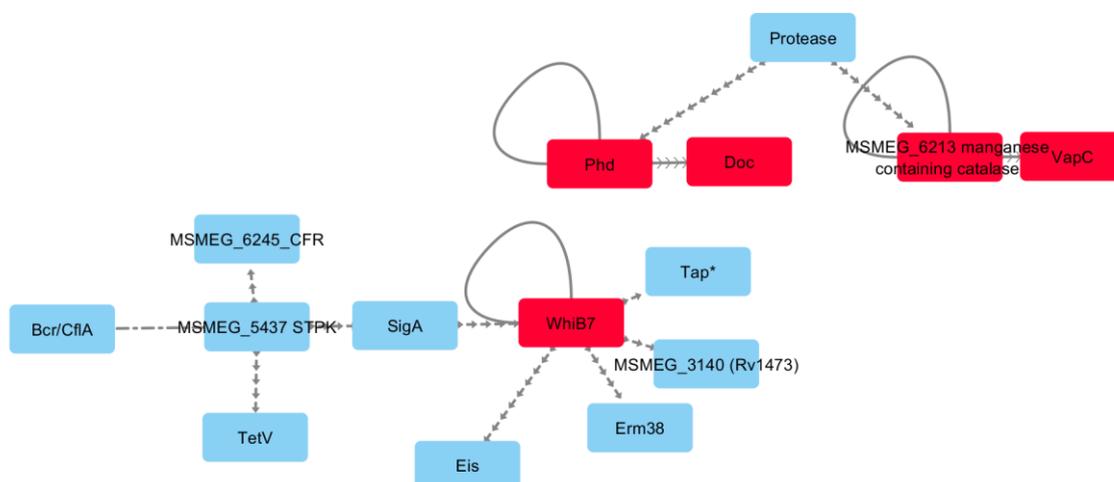
Таким образом, канамицин является индуктором экспрессии гена *whiB7* (в 13,2 раз), генов модуля ТА *phd/doc* в (2,8 раз), а также модуля ТА - *vapBC2* в 9,6 раз. Офлоксацин индуцирует экспрессию гена *whiB7* в 2,37 раза и генов модуля ТА - *vapBC2* в 6 раз. Воздействие стрептомицином на клетки *M. smegmatis* mc² 155 не оказывало значимого влияния на уровень транскрипции исследуемых генов и генных модулей.

В отличие от канамицина и стрептомицина, офлоксацин, в основном, приводил к снижению уровня экспрессии исследуемых генов: *araC* в 2,7; *ltmA* в 3,1; *marR* 2,3; *mtrA* в 2; *napM* в 27, а также *tetR*, под действием офлоксацина, демонстрировал снижение уровня экспрессии в 5 раз.

Построение генетических сетей перекрестной лекарственной устойчивости. Для понимания механизмов индукции лекарственной устойчивости и ответа на стресс, вызванный

антибиотиками, составлена предполагаемая схема генетического контроля перекрестной лекарственной устойчивости, связывающая отобранные транскрипционные факторы и подконтрольные им гены.

На Рисунке 5, представлена генетическая сеть, состоящая из отобранных транскрипционных факторов и генов ТА, индукция которых изменялась под действием канамицина.

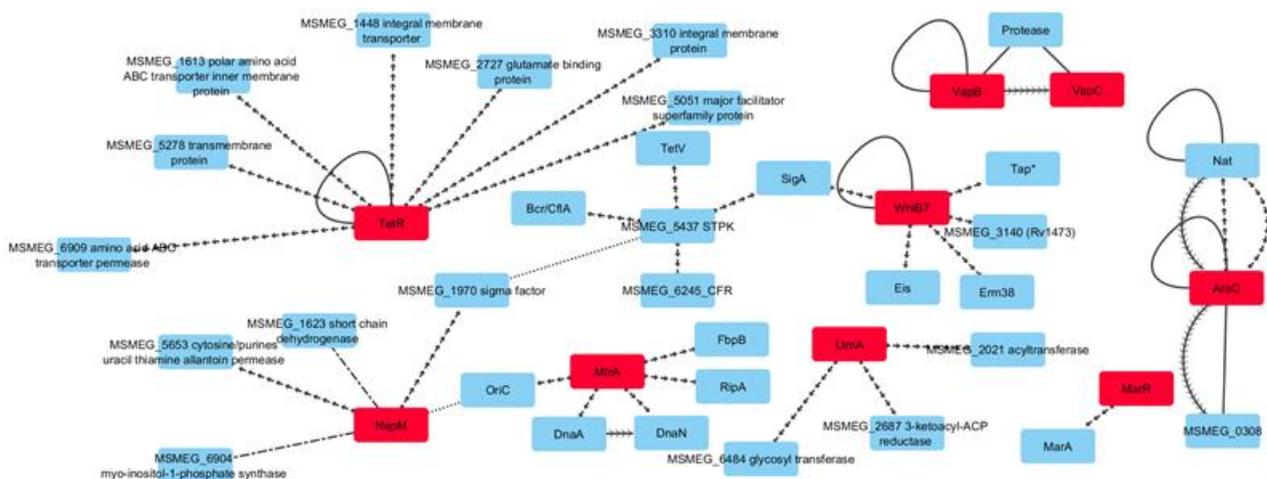


*-псевдоген у *M. smegmatis*

Рисунок 5. Предполагаемая схема генетического контроля систем ТА и транскрипционных регуляторов и их влияние на фенотип под действием офлоксацина. Красным выделены исследованные, на транскрипционном уровне, гены, Синим – подконтрольные им гены. Стрелками показаны генные взаимодействия, штрихпунктиром – негативная регуляция экспрессии гена *bcr*. Линии со стрелками – оперонная организация генов; петлями обозначена саморегуляция экспрессии.

Канамицин является антибиотиком, обладающим более выраженным эффектом действия, чем его ближайший родственник – стрептомицин. Таким образом, по сравнению со стрептомицином, наблюдался более выраженный клеточный ответ на воздействие антибиотиком на клетки *M. smegmatis*. Предположительно, протеинкиназа MSMEG_5437, осуществляющая надтрансляционную регуляцию экспрессии генов (фосфорилирование анти-сигма факторов), в ответ на присутствие канамицина в клетке индуцирует экспрессию гена *whiB7*. Таким образом, перекрестная лекарственная устойчивость, возможно, реализуется при помощи экспрессии генов регулона *WhiB7*, а также генов, чья экспрессия находится под контролем активности киназы MSMEG_5437, Рисунок 5.

Другим механизмом действия обладает исследуемый антибиотик – офлоксацин, мишенью действия которого является ДНК-гираза. Суммируя данные, полученные при проведении анализа изменения уровня транскрипции, нами была составлена предполагаемая схема участия исследуемых генов в реализации перекрестной лекарственной устойчивости, вызываемой фторхинолонами (Рисунок 6).



*-псевдоген у *M. smegmatis*

Рисунок 6. Предполагаемая схема генетического контроля систем ТА и транскрипционных регуляторов и их влияние на фенотип под действием офлоксацина. Красным выделены исследованные на транскрипционном уровне гены, синим – подконтрольные им гены. Стрелками показаны генные взаимодействия, штрихпунктиром – негативная регуляция экспрессии гена *bcr* и *MSMEG_6904*, пунктиром – слабые взаимодействия. Линии со стрелками – оперонная организация генов; петли обозначена саморегуляция экспрессии.

Как видно из результатов транскрипционного анализа происходило увеличение уровня экспрессии гена *whiB7*, а также снижение уровня экспрессии остальных исследуемых генов (Таблица 7). По аналогии с ответом на действие канамицина на клетки *M. smegmatis* наблюдалась индукция экспрессии гена *whiB7*. Предположительно, имеет место индукция с привлечением киназы *MSMEG_5437* (см. Рисунок 5 и Рисунок 6).

При этом происходит значительное, в 27 раз, снижение экспрессии гена нуклеотид-ассоциированного белка *NapM*. Данный белок неспецифично связывается с А/Т богатыми участками ДНК, в частности с *oriC*, а также предотвращает нарушение структуры ДНК, ферментом ДНКазой I. Помимо неспецифичной регуляции репликации, *NapM* разнонаправленно регулирует экспрессию генов, участвующих в реализации лекарственной устойчивости *M. smegmatis*. Таким образом, снижение количества белка *NapM* в клетке снимает репрессию транскрипции клеточных транспортеров, участвующих в транспорте антибиотика из клетки.

По литературным данным, снижение транскрипции гена *napM* приводит к снижению экспрессии генов, чьи продукты участвуют в репликации ДНК: *gyrAB* (ДНК-гираза), *topA* (топоизомераза I). Таким образом, можно предположить, что экспрессия *napM* находится во взаимосвязи с экспрессией генов ДНК-гиразы или топоизомеразы I и зависит от экспрессии гена, продукт которого является неописанной мишенью фторхинолонов и связан с осуществлением репликации.

Отдельно стоит рассмотреть изменение уровня экспрессии генов антибиотикотолерантности, в частности *varBC2*. Данный модуль ТА является новым кандидатом в семейство ТА II типа. Интересен тот факт, что изменения в уровне экспрессии этого модуля заметно отличаются от экспрессии других модулей ТА *M. smegmatis*, в 9,5 раз против 2,5 у *phd/doc* при индукции канамицином и в 6 раз при воздействии офлоксацином. Уровень экспрессии генов других трех ТА модулей при воздействии офлоксацином на *M. smegmatis* не изменялся. Таким образом, *VarBC2*, возможно, является ключевым модулем ТА II типа, осуществляющим антибиотикотолерантность *M. smegmatis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе мы исследовали явление перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии низких концентраций антибиотиков различных химических классов (стрептомицин, канамицин, офлоксацин, тетрациклин и эритромицин), Таблица 7.

Таблица 7. Перекрестная лекарственная устойчивость, индуцированная низкими концентрациями антибиотиков

Индуктор	Снижение чувствительности, класс антибиотика				
	Фторхинолоны	Азалиды	Тетрациклины	Макролиды	Аминогликозиды
Тетрациклин					
Эритромицин	н/д	Линкозамиды	н/д	Макролиды	н/д
Стрептомицин	н/д	н/д	н/д	Ансамицины	н/д
Офлоксацин	н/д	β-лактамы	н/д	н/д	Аминогликозиды
Канамицин	Фторхинолоны	β-лактамы	н/д	Макролиды	н/д

Были отобраны гены-кандидаты, потенциально объясняющие полученные данные, и проведен их транскрипционный анализ в присутствии выбранных антибиотиков.

Антибиотики индуцировали экспрессию гена *whiB7*, а также генов систем токсин-антитоксин: *varBC2* и *phd/doc*.

Нами было детектировано снижение уровня экспрессии 6 генов, транскрипционных факторов в присутствии офлоксацина. Наиболее значительное снижение экспрессии наблюдалось у гена нуклеотид-ассоциированного белка NapM, потенциально связанного с процессом репликации ДНК *M. smegmatis*.

Впервые было показано участие модуля TA – *VarBC2* в клеточном ответе на стресс, вызываемый антибиотиками.

Анализ профиля экспрессии отобранных генов показал, что основным фактором, определяющим перекрестную лекарственную устойчивость, является транскрипционный активатор *WhiB7*, позитивно регулирующий экспрессию генов собственного регулона.

Методами биоинформатического и статистического анализа, а также анализа последовательностей ДНК генов регулона *WhiB7* клинических изолятов *M. tuberculosis* были исследованы различные генотипические линии *M. tuberculosis* и выявлены мутации в генах регулона *WhiB7*, ассоциированные с принадлежностью к определенным филогенетическим линиям и сублиниям *M. tuberculosis*.

Обнаруженные аллельные варианты генов регулона *WhiB7*, а также малоизученный ген регулона *WhiB7* - *rv1473*, кодирующий клеточный транспортер, были исследованы на способность изменять уровень лекарственной устойчивости модельного объекта *M. smegmatis* mc² 155. В результате анализа лекарственной чувствительности был определен фенотип лекарственной устойчивости, реализуемой двумя клеточными транспортерами и транскрипционным активатором *WhiB7*.

Результаты, полученные в данной работе, открывают перспективы для исследований в области природной лекарственной устойчивости и ее развития. Также они показывают важность изучения перекрестной лекарственной устойчивости для реализации комплексных рациональных подходов лечения туберкулеза и сопутствующих бактериальных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В результате сравнительного геномного анализа составлен список 43 полиморфных генов резистоста *M. tuberculosis* (*whiB-like*, *aph*, гены клеточных транспортеров, модификаторов мишеней и лекарств);
2. Установлена корреляция дефектных вариантов генов регулона WhiB7 (*whiB7* Δ G₁₉₁ и *tap*(insC₅₈₁) с филогенетическими линиями *M. tuberculosis* EAI-Manilla и Beijing.
3. Показана роль регулятора транскрипции WhiB7 в обеспечении природной лекарственной устойчивости к амикацину, кларитромицину, имипенему, хлорамфениколу и тетрациклину, продукта гена *tap* - к макролидам, аминогликозидам, фторхинолонам и тетрациклинам, продукта гена *rv1473* - к аминогликозидам и фторхинолонам;
4. У *M. smegmatis* mc² 155 обнаружена индукция перекрестной лекарственной устойчивости: стрептомицином - к рифампицину; канамицином - к макролидам, фторхинолонам и β -лактамам; офлоксацином - к аминогликозидам и β -лактамам;
5. Канамицин и офлоксацин в низких концентрациях влияют на экспрессию генов резистоста: индуцируют экспрессию *whiB7* и генов модулей систем токсин-антитоксин II типа - *phd/doc* и *vapBC2*; офлоксацин снижает уровень экспрессии генов: *napM*, *tetR*, *araC*, *ltnA*, *marR*, *mtrA*;
6. Составлена предполагаемая схема генетического контроля природной лекарственной устойчивости и антибиотикотолерантности *M. smegmatis* mc² 155 на основе изменения экспрессионного профиля 11 генов резистоста (*whiB7*, *napM*, *ltnA*, *tetR*, *rbpA*, *mtrA*, *mfpB*, *lfrR*, *marR*, *araC*, *blaS*) и 4 генов модулей токсин-антитоксин (*mazEF*, *phd/doc*, *vapBC30*, *vapBC2*).

Список опубликованных работ по теме диссертации.

В журналах рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. **К. В. Шур**, Д. А. Маслов, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко. Генотипирование клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в Московском регионе, методом MIRU-VNTR // Вестник РГМУ. 2017 т. 1 с 48-51;
2. **Shur KV**, Zaychikova MV, Mikheecheva NE, Klimina KM, Bekker OB, Zhdanova SN, Ogarkov OB, Danilenko VN. Draft genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain B9741 of Beijing B0/W lineage from HIV positive patient from Siberia. *Genomics Data*. 2016 Aug 3;10:61-62;
3. Maslov D.A., Zaïchikova M.V., Chernousova L.N., **Shur K.V.**, Bekker O.B., Smirnova T.G., Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Zhang Y., Danilenko V.N. Resistance to pyrazinamide in Russian *Mycobacterium tuberculosis* isolates: *pncA* sequencing versus Bactec MGIT 960. // *Tuberculosis (Edinb)*. 2015, 95(5), Pp. 608–612;
4. Maslov DA, **Shur KV**, Bekker OB, Zakharevich NV, Zaichikova MV, Klimina KM, Smirnova TG, Zhang Y, Chernousova LN, Danilenko VN. Draft Genome Sequences of Two Pyrazinamide-Resistant Clinical Isolates, *Mycobacterium tuberculosis* 13-4152 and 13-2459. *Genome Announc*. 2015 Jul 2;3(4);
5. **Shur KV**, Klimina KM, Zakharevich NV, Maslov DA, Bekker OB, Zaychikova MV, Kamaev EY, Kravchenko MA, Skornyakov SN, Zhang Y, Danilenko VN. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Strain E186hv of Beijing B0/W Lineage with Reduced Virulence. *Genome Announc*. 2015 May 7; 3(3).

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

1. **Шур К.В.** Зайчикова М.В. Беккер О.Б. Даниленко В.Н. Роль генов резистома *Mycobacterium tuberculosis* в развитии МЛЮ и ШЛЮ фенотипа // Проблемы медицинской микологии. 2016. Т. 18. № 2. Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Капшкские чтения) Тезисы докладов. стр. 130-131. Санкт Петербург, 2016. **Устный доклад Шура К.В.**
2. **Shur K.V.**, Maslov D.A., Bekker O.B., Danilenko V.N. Modeling Whib7-dependent system of intrinsic drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* on the model object - *Mycobacterium smegmatis* // The 2015 TB SUMMIT, European Scientific Conferences, United Kingdom, London, March 23-26, 2015. **Постерный доклад.**
3. **K. Shur**, D. Maslov, O. Bekker, M. Alvarez and V. Danilenko. The WhiB7 gene polymorphism and its regulon genes in *Mycobacterium tuberculosis*, as a new mechanism of drug resistance. 38th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS) 2013, Санкт-Петербург, 2013 *FEBS Journal* 280 (Suppl. 1) (2013), p. 366. **Постерный доклад.**
4. Зайчикова М.В., Михеечева Н.Е., Шур К.В., Огарков О.Б., Скорняков С.Н., Даниленко В.Н. Выявление и разработка методов диагностики линий *M. tuberculosis*, потенциально опасных для людей, находящихся в экстремальных условиях Арктики // Семинар по определению приоритетных направлений и разработке новых технологий укороченной адаптации человека к неблагоприятным климатическим условиям Арктики. **Устный доклад Зайчиковой М.В.**
5. II Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров, Санкт-Петербург, 2013 Моделирование WhiB7-зависимой системы природной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* на модельном объекте – *Mycobacterium smegmatis* // Сборник тезисов. 2013. стр. 278-279. **Устный доклад Шура К.В.**

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность зав. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, д.б.н., проф. **Валерию Николаевичу Даниленко**, с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, к.б.н. **Ольге Борисовне Беккер** и н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, к.б.н. **Дмитрию Антоновичу Маслову** за наставничество и вдумчивое руководство работой.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаборатории генетики микроорганизмов за постоянную поддержку, а в частности:

Марине Викторовне Зайчиковой, Ксении Михайловне Климиной и Марии Георгиевне Алексеевой за помощь на разных стадиях выполнения работы; **Наталье Владимировне Захаревич** и **Наталье Евгеньевне Михеечевой** за помощь в освоении биоинформатических методов; **Алексее Александровичу Ватлину** и **Наталье Игоревне Акимовой**.

Автор благодарит доцента международного биологического центра МГУ им. Ломоносова **Михаила Михайловича Бабыкина**, коллектив Отдела микробиологии и ПЦР диагностики Уральского НИИ фтизиопульмонологии, в частности зав. отделом, к.б.н., **Марионеллу Анатольевну Кравченко** и к.б.н. **Татьяну Валерьевну Умпелеву**, коллектив Отдела Микробиологии Центрального Научно-Исследовательского Института Туберкулеза, в частности: зав. отделом, д.б.н., проф. **Ларису Николаевну Черноусову**, а также руководителя лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций НЦ Проблем здоровья семьи и репродукции человека, д.м.н. **Олега Борисовича Огаркова**.

Отдельно автор выражает благодарность зав. сектором анализа и хранения микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН, д.б.н. **Майе Александровне Петровой** и зав. лаб. Молекулярной генетики, Московского физико-технического института (государственного университета) **Илье Владимировичу Манухову** за ценные замечания, сделанные при рецензировании данной работы перед ее апробацией.