ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Шур Кирилл Владимирович

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА *WHIB7* И ГЕНОВ ЕГО РЕГУЛОНА В ПРИРОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У МИКОБАКТЕРИЙ

03.02.07 - генетика.

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
В. Н. Даниленко

Москва
2017 год

Содержание

Содержание **2**

Введение **6**

Глава 1. Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, методы диагностики и противотуберкулезная химиотерапия. **15**

1.1. Туберкулезная инфекция 15

1.1.1 Различные филогенетические линии M. tuberculosis *18*

1.2. Методы диагностики туберкулеза 21

1.2.1. Метод микрокопирования окрашенного образца и культуральные методы *22*

1.2.2. Молекулярные методы диагностики *22*

1.2.3. Методы Масс-спектрометрии и ИФА-γ тест *23*

1.2.4. Анализ липоарабиноманнана *24*

1.3. Противотуберкулезная химиотерапия 24

Глава 2. Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*, природная и приобретенная **28**

2.1. Лекарственная устойчивость 28

2.2. Приобретенная лекарственная устойчивость 30

2.2.1. Устойчивость к рифампицину *30*

2.2.2. Устойчивость к изониазиду *30*

2.2.3. Устойчивость к фторхинолонам *31*

2.2.4. Устойчивость к стрептомицину *32*

2.2.5. Устойчивость к канамицину *32*

2.2.6. Устойчивость к пиразинамиду *33*

2.2.7. Устойчивость к сиртуро/бедаквилин/TMC207 ..... *34*

2.3. Природная лекарственная устойчивость 38

2.3.1. Белки модификаторы мишеней *38*

2.3.2 Белки деградации лекарств *40*

2.3.3. Белки модификаторы лекарств *41*

2.3.4. Белки молекулярной мимикрии *42*

2.3.5. Системы токсин-антитоксин *43*

2.3.6. Белки клеточного транспорта *45*

2.3.7. Организация клеточной стенки, её проницаемость. *46*
2.3.8. Белки клеточного стресса *48*
2.3.9. Семейство транскрипционных факторов WhiB *52*
2.3.10. Транскрипционный фактор WhiB7 ..... *57*
2.4. Вещества, снижающие лекарственную устойчивость (адъюванты антибиотиков) 64
Глава 3. Материалы и методы 66
3.1. Бактериальные штаммы, использованные в работе 66
3.2. Плазмидные векторы, использованные в работе 66
3.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе 67
3.3.1. ДНК, использованная в работе *67*
3.3.2. Выделение РНК *68*
3.3.3. Проведение реакции обратной транскрипции *68*
3.4. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами 69
3.4.1. Амплификация ДНК *69*
3.4.2. Амплификация ДНК в режиме реального времени *69*
3.4.3. Выделение и очистка плазмидной ДНК *70*
3.4.4. Очистка фрагментов ДНК *71*
3.4.5. Выделение ДНК из агарозного геля *71*
3.4.6. Реакция рестрикции *71*
3.4.7. Реакция лигирования *72*
3.4.8. Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле *72*
3.4.9. Количественная оценка ДНК, РНК *73*
3.4.10. Сайт-направленный мутагенез гена whiB7 ..... *73*
3.4.11. Пиросеквенирование ДНК M. tuberculosis *73*
3.4.12. Генотипирование клинических изолятов M. tuberculosis *74*
3.5. Работа с бактериальными культурами 74
3.5.1. Подбор концентраций антибиотиков *75*
3.5.2. Оценка уровня лекарственной чувствительности *75*
3.5.3. Получение химически-компетентных клеток E. coli *76*
3.5.4. Трансформация компетентных клеток E. coli *77*
3.5.5. Получение электрокомпетентных клеток M. smegmatis *77*

3.5.6. Электротрансформация компетентных клеток M. smegmatis *77*

3.5.7. ПЦР-скрининг клеток трансформантов *78*

3.6. Биоинформатические методы и методы статистического анализа данных78

Глава 4. Результаты и обсуждение 80

4.1. Биоинформатический анализ генов регулона WhiB7 и других основных групп генов природной лекарственной устойчивости 80

4.1.1. Формирование каталога генов природной лекарственной устойчивости M. tuberculosis *82*

4.1.2. Оценка связи между мутациями в генах природной лекарственной устойчивости и линией или фенотипом лекарственной устойчивости M. tuberculosis. *86*

4.1.3. Поиск мутаций генов регулона WhiB7 у клинических изолятов M. tuberculosis *90*

4.1.4. Сравнительный геномный анализ клинических изолятов M. tuberculosis *94*

4.1.5. Биоинформатическая оценка влияния отобранных аллельных вариантов генов регулона WhiB7 на функциональную активность кодируемых ими белков *98*

4.1.6. Заключение к разделу 4.1. ..... *101*

4.2. Оценка влияния генов регулона WhiB7 на уровень лекарственной устойчивости 102

4.2.1 Клонирование генов регулона WhiB7 в M. smegmatis *102*

4.2.2. Влияние сверхэкспрессии гена whiB7 на уровень лекарственной устойчивости M. smegmatis *104*

4.2.3. Влияние сверхэкспрессии гена tap на уровень лекарственной устойчивости M. smegmatis *105*

4.2.4. Влияние сверхэкспрессии гена Rv1473 на уровень лекарственной устойчивости M. smegmatis *106*

4.2.5. Определение МИК антибиотиков для трансформантов M. smegmatis *108*

4.2.6. Заключение к разделу 4.2. ..... *110*

4.3. Исследование явления перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155 111

4.3.1. Принципы и методика изучения индукции перекрестной лекарственной устойчивости к антибиотикам у M. smegmatis *111*

4.3.2. Отбор генов-кандидатов, потенциально определяющих выявленный тип перекрестной устойчивости *119*

4.3.3. Исследование экспрессии генов природной перекрестной лекарственной устойчивости и толерантности M. smegmatis *123*

4.3.4. Заключение к разделу 4.3. ..... *131*

Заключение **133**

Выводы **136**

Список сокращений, использованных в работе **137**

Словарь терминов **139**

Список Литературы **140**

Приложение **170**

Приложение А **170**

Приложение Б **177**

Приложение В **180**

Благодарности **187**

Введение

Mycobacterium tuberculosis - возбудитель туберкулеза, который является одним из самых опасных заболеваний и основной причиной смертности людей от бактериальных инфекций [WHO, 2015]. На сегодняшний день в мире ежегодно фиксируется около 9,6 миллионов случаев заболевания туберкулезом, из них 12% являются ВИЧ-положительными, а смертность в ВИЧ-положительной группе достигает 40%. Несмотря на сокращение заболеваемости туберкулезом (с 1990 года на 47%) растет доля случаев заболевания туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Примерно половина таких случаев (~54%) приходится на Индию, Китай и Российскую Федерацию [WHO, 2015]. Фактором развития данных опасных форм заболевания является селекция штаммов несущих мутации в генах-мишенях противотуберкулезных лекарств [Leylabadlo et al., 2016].

Серьезную проблему при лечении туберкулеза представляет наличие у возбудителя заболевания, *Mycobacterium tuberculosis*, системы генов природной лекарственной устойчивости (резистом) [Morris et al., 2005]. Данная система характеризуется существованием у микроорганизма базового уровня устойчивости к антибиотикам, не связанного с появлением мутаций в генах-мишенях [Perry et al., 2014]. 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. [McArthur et al., 2015; Perry et al., 2014].

В частности, у актиномицетов, система природной устойчивости опосредована белками семейства WhiB WhiB – семейство транскрипционных факторов, найденное только у актиномицетов, среди которых существует множество как патогенных организмов рода *Mycobacterium*, например, *M. leprae*, *M. tuberculosis*, так и представителей рода *Streptomyces*, являющихся важнейшими

продуцентами антибиотиков. Это семейство транскрипционных факторов играет важную роль в жизни клетки. Доказано, что гены *whiB* семейства контролируют процессы деления клетки, поддержания окислительного гомеостаза, вирулентности и устойчивости к антибиотикам [Burian et al., 2012; Geiman et al., 2006; Larsson et al., 2012]. Ключевым регулятором природной устойчивости, входящим в данное семейство (WhiB-*like*), является глобальный регулятор транскрипции WhiB7. Известно, что штаммы, мутантные по *whiB7*, являются чувствительными к ряду лекарственных препаратов, в том числе тетрациклину, макролидам, аминогликозидам [Burian et al., 2012; Morris et al., 2005]. WhiB7, в свою очередь, контролирует экспрессию генов, объединенных в регулон. В состав регулона входят двенадцать генов, среди которых в реализации природной устойчивости выделяют: *eis* (ген аминогликозид-ацетилтрансфераза), *erm37* (ген рибосомальной РНК-метилтрансферазы), *tap* (ABC транспортер), *Rv1473* (MFS транспортер) [Morris et al., 2005].

Особую роль в появлении МЛУ у штаммов микобактерий может играть возникновение перекрестной лекарственной устойчивости, определяемой генами резистома и, в частности, генами, входящими в регулон WhiB7 [Perry et al., 2014].

Лечение сопутствующих заболеваний с использованием антибиотиков может приводить к повышению уровня лекарственной устойчивости к другим антибиотикам возбудителей туберкулеза. Развитие перекрестной лекарственной устойчивости, а также рост устойчивости к антибиотикам путем активации системы генов резистома является серьезной проблемой в медицине и требует специальных научных исследований для поиска путей ее преодоления.

Сложность и длительность проведения генетических исследований на возбудителе туберкулеза *M. tuberculosis* заставили найти модельный организм. В качестве такового используют штамм *M. smegmatis* mc^2 155, который является подходящим модельным объектом удобным для проведения целого ряда (но не всех) генетических/молекулярно-биологических и микробиологических исследований [Etienne et al., 2005]. 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]. Все это делает *M. smegmatis* подходящим модельным организмом и для настоящего исследования.

Анализ данных полученных в данной работе на *M. smegmatis* проводился с учетом сходства и различия его генетических систем с *M. tuberculosis*. Расшифровка механизмов взаимодействия генов резистома, определение их вклада в индукцию лекарственной устойчивости и формирования МЛУ и ШЛУ (широкой лекарственной устойчивости) у возбудителей туберкулеза, необходимы для разработки эффективных курсов лечения больных и снижения риска возникновения опасных форм туберкулеза.

В данной работе мы провели анализ уровня лекарственной устойчивости, определяемой аллельными вариантами генов регулона WhiB7 *M. tuberculosis*. Критерием для отбора аллельных вариантов генов регулона WhiB7 была связь наличия данного аллельного варианта исследуемого гена и филогенетической принадлежностью штаммов *M. tuberculosis*.

Также нами была изучена перекрестная лекарственная устойчивость *M. smegmatis*, вызываемая антибиотиками различных химических классов. На основе профиля экспрессии генов резистома, отобранных по результатам анализа перекрестной лекарственной устойчивости у *M. smegmatis*, были составлены предполагаемые схемы генетического контроля перекрестной лекарственной устойчивости.

<u>Цель работы</u>: Изучить роль генов резистома, в частности генов регулона WhiB7, в формировании лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*.

<u>Задачи:</u>

1. Провести биоинформатический поиск мутаций генов резистома (*whiB-like*, *aph*, *aac*, гены регулона WhiB7, гены клеточных транспортеров), как в геномах штаммов *M. tuberculosis*, доступных в GenBank NCBI, так и клинических изолятов *M. tuberculosis*. Для этого:
   а. Составить каталог генов природной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*;
   б. Провести поиск мутаций генов резистома, в том числе регулона WhiB7;
   в. Определить корреляцию между мутациями в генах резистома 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* mc^2 155. Для этого:
   а. Провести анализ возникновения перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155;
   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 с генов природной лекарственной устойчивости, включающий в себя аллельные варианты генов резистома, 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 токсин-антитоксин II типа (*phd/doc*, *vapBC2*, *vapBC30* и *mazEF*) у *M. smegmatis* mc^2 155 в присутствии аминогликозидных антибиотиков, а также офлоксацина.

Практическая значимость:

Анализ аллельных вариантов генов резистома *M. tuberculosis* (генов *whiB-like*, *aph*, *aac*, генов регулона WhiB7, генов клеточных транспортеров), расшифровка механизмов взаимодействия этих генов, их вклада в индукцию лекарственной устойчивости в модельной системе *M. smegmatis* mc^2 155 позволил расширить понимание закономерностей возникновения лекарсвтвенной устойчивости у возбудителя туберкулеза – *M. tuberculosis*.

Результаты, полученные в данной работе, позволяют прояснить 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.).

Знание генетического контроля развития перекрестной лекарственной устойчивости и антибиотикотолерантности позволит подобрать дозы и схемы противотуберкулезной терапии, повышающие шанс на проведение успешного лечения.

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 показали индукцию транскрипции генов резистома уже при 0,02 мкг/мл, таким образом, попадание использованных в животноводстве антибиотиков (стерптомицина) 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).

<u>Положения, выносимые на защиту:</u>

1. Транскрипционный активатор WhiB7 *M. tuberculosis* регулирует лекарственную устойчивость *M. smegmatis* mc^2 155 к β-лактамам, а также является медиатором перекрестной лекарственной устойчивости;
2. Клеточный транспортер Tap *M. tuberculosis* участвует в обеспечении лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155 к антибиотикам класса 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* mc^2 155, являются индукторами природной перекрестной лекарственной устойчивости;
4. Офлоксацин является индуктором перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155 к аминогликозидным и β-лактамным антибиотикам.

Степень достоверности и апробация результатов.

Автором опубликовано 6 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.

Апробация диссертационной работы была проведена 27 февраля 2017 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

В журналах рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. **К. В. Шур**, Д. А. Маслов, Н. Е. Михеечева, Н. И. Акимова, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко. *whib7* и *tap* - модуляторы природной лекарственной устойчивости микобактерий к β-лактамным антибиотикам, макролидам и фторхинолонам // Генетика – 2017 – (в печати);
2. **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;
3. **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;
4. Maslov D.A., Zaĭchikova 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;
5. 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);
6. **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 МЛУ и ШЛУ фенотипа // Сборник

тезисов «Научно-практической конференции по медицинской микологии (XIX Кашкинские чтения)». Проблемы медицинской микологии – 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 // Papers by 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*. **Устный доклад Шура К.В.**

Глава 1. Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, методы диагностики и противотуберкулезная химиотерапия

1.1. Туберкулезная инфекция

M. tuberculosis является основным возбудителем заболевания туберкулез. Заболевание, классифицируемое как туберкулез, может быть вызвано и другими представителями микобактерий туберкулезного комплекса (МТК). В МТК включают следующих представителей: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* и *M. canetti* [Прозоров А.А. et al., 2011; Thabet et al., 2016].

M. africanum являлся одним из самых распространенных возбудителей туберкулеза в странах Африки. В работе [Niobe-Eyangoh et al., 2003] содержались данные о том, что доля больных туберкулезом в Камеруне, вызванным *M. africanum* составляет около 9%, хотя еще в 1983 г. эта цифра достигала 56%, в то же время доля больных инфицированных *M. tuberculosis* увеличилась с 44% до 91% за тот же временной промежуток.

M. bovis, возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота, также, при коинфекции с *M. tuberculosis,* является причиной развития туберкулеза человека. *M. bovis* является низко-трансмиссивным и практически не передается от человека к человеку или от животного к человеку. Основной путь передачи возбудителя - непастеризованное молоко [El-Sayed et al., 2015]. Вакцина, изготовленная на основе аттенуированных штаммов *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette—Guérin), используется для профилактики туберкулеза [Behr et al., 1999].

M. canetti является относительно новым членом МТК. *M. canetti* был впервые выделен у двухлетнего мальчика из Сомали в 1969 году, а второй случай заболевания обнаружен у мужчины с ВИЧ инфекцией из Кении. Данный микроорганизм характеризуется быстрым ростом и наличием уникальных фенольных гликопептидов и липо-олигосахаридов. Клинические проявления туберкулеза, вызванного *M. canetti,* не отличаются от проявлений, вызванных *M. tuberculosis* [Soolingen Van et al., 1997].

M. microti является возбудителем туберкулеза скота и человека. В мире зафиксировано всего 13 случаев заболевания туберкулезом, вызванным этим микроорганизмом. Туберкулез, вызванный *M. microti*, поддается лечению и приводит к летальному исходу, только в случае иммунодефицита [Ahmad et al., 2004].

Основным методом типирования бактерий, принадлежащих к МТК, является ПЦР участков генома, комбинация которых, позволяет отнести выделенную микобактерии к определенному виду – RD (регионы отличия), Таблица 1.1.

Таблица 1.1. Регионы отличия микобактерий туберкулезного комплекса (МТК)

RD	Виды	ORF, ген	Функция
RD1	Все *M. bovis* BCG	*Rv3871–Rv3879c*	PE, PPE, ESAT-6
RD2	Некоторые *M. bovis* BCG	*Rv1978–Rv1988*	Метилтрансферазы, пермиазы, MPT64, рибонуклеотид редуктазы, мембранные и секреторные белки, транскрипционный регулятор LysR
RD3	*M. africanum*, *M. microti*, некоторые *M. bovis*, все *M. bovis* BCG	*Rv1573–Rv1586c*	профаг phiRv1
RD4	Некоторые *M. bovis*, все *M. bovis* BCG	*Rv1505c–Rv1516c*	Различные мембранные белки и ферменты, вовлеченные в синтез экзополисахаридов
RD5	*M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG	*Rv2346c–Rv2353c*	ESAT-6, PE, PPE, фосфолипаза C
RD6	Вариабельный у всех	*Rv3425–Rv3428c*	PPE, IS1532
RD7	Все, кроме *M. tuberculosis*, *M. canettii*	*Rv1964–Rv1977*	Различные экспрортерные и интегральные белки, инвазины MceP
RD8	*M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG	*ephA–lpqG*	Эпоксид гидролаза, монооксигеназа, липопротеин, ESAT-6, PE, PPE
RD9	Все, кроме *M. tuberculosis*, *M. canettii*	*cobL–Rv2075*	Precorrin methylase, оксиредуктаза, транспортный белок
RD10	*M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG	*Rv0221–Rv0223c*	Еноил-CoA-гидратаза, альдегид-дегидрогеназа
RD11	*M. bovis*, *M. bovis* BCG	*Rv2645–Rv2695c*	Профаг phiRv2

RD12	*M. bovis*, *M. bovis* BCG	*sseC–Rv3121*	Тиосульфатсульфотрансфераза, molybdopterin converting factor, метилтрансфераза, цитохром P450
RD13	*M. bovis*, *M. bovis* BCG	*Rv1255c–Rv1257c*	Транскрипционный регулятор, цитохром P450, дегидрогеназа
RD14	Некоторые BCG	*Rv1765c–Rv1773c*	PE-PGRS, транскрипционный регулятор IclR
RD15	Некоторые BCG	*Rv0309–Rv0312*	Консервативные белки
RD16	Некоторые BCG	*Rv3400–3405c*	Транскрипционный регулятор, консервативные белки, β-фосфогликомутаза
TbD1	Современный *M. tuberculosis*	*mmpS6, mmpL6*	Мембранные белки

RD1 – является участком, отсутствующим у штаммов *M. bovis* BCG [Noon et al., 2014], но присутствующим у всех других вирулентных микобактерий. Некоторые из RD несут в себе гены, участвующие в процессах вирулентности: RD3 и RD11 – профаги, фосфолипазу C – RD5, инвазины – RD7 и систему синтеза экзополисахаридов – RD4.

Таким образом, различия внутри МТК определяется наличием/отсутствием определенных RD, несущих гены вирулентности и другие гены, участвующие в реализации патогенности и особенностей метаболизма бактерий [Cole, Stewart, 2002].

Туберкулезная инфекция передается, в основном, воздушно-капельным путем и начинается с проникновения возбудителя в альвеолы легких, а затем в антиген-представляющие клетки, такие как макрофаги или дендритные клетки. Данные типы клеток переносят микобактерии в лимфатические узлы, где и начинается первичная ответная реакция организма хозяина [Méndez-Samperio, 2016]. Кроме того, проникновение микроорганизма в человеческий организм не всегда приводит к развитию заболевания в острой форме, а к развитию так называемой латентной форме туберкулеза [Kondratieva et al., 2014; Salgame et al., 2015]. По экспериментальным оценкам, около трети населения планеты являются носителями такого рода инфекции [WHO, 2015].

M. tuberculosis способен распространяться практически в любых органах и тканях человеческого организма. Отмечены случаи туберкулеза легких (самый распространенный вид заболевания) [Leylabadlo et al., 2016], туберкулеза молочной железы [Thimmappa et al., 2015], туберкулеза спинного мозга [Kumar, 2016], туберкулеза брюшины [Edwards и др., 2016], туберкулеза глаз [Shakarchi, 2015], туберкулеза кости [Golden et al., 2005] и других форм внелегочного туберкулеза [Golden et al., 2005].

Классической клинической картиной туберкулеза легких является: кашель с мокротой, на поздних стадиях с кровью (кровохаркание), повышенная утомляемость, ночная потливость, лихорадка, сильное снижение веса.

Туберкулез детерминируется на две стадии развития болезни: закрытая и открытая. При закрытой форме туберкулеза не наблюдается выделение бактерий из организма больного (моча, слюна, кал). Пациенты с такой формой заболевания не опасны для окружающих. Открытая же форма характеризуется бактериовыделением из мокроты или иных естественных жидкостей больного. К открытой форме относят случаи с явным нарушением функционирования пораженных органов. К таким проявлениям можно отнести: легочная каверна, язвенная форма туберкулеза бронхов, бронхиальный или торакальный свищ, туберкулез верхних дыхательных путей (ротовой полости, носа, носоглотки и ротоглотки) [Lawn et al., 2011].

1.1.1 Различные филогенетические линии *M. tuberculosis*

В первой половине 20 века исследования, направленные на изучение фенотипических особенностей *M. tuberculosis*, на морских свинках, показали, что изоляты, выделенные в Индии, менее вирулентные, чем из Англии [Mitchison et al., 1960]. В последующих работах, направленных на исследование штамм-специфичных эффектов вирулентности и иммуногенности, проведенных на других лабораторных животных и культурах клеток макрофагов, были получены неопровержимые доказательства генетической изменчивости *M. tuberculosis* и, как

следствие, различие фенотипических особенностей изолятов *M. tuberculosis* [Balasubramanian et al., 1992; Williams et al., 2005].

В связи с тем что фенотипические различия напрямую связаны с филогенетикой *M. tuberculosis*, необходимо было разработать методы для разделения групп изолятов на отдельные филогенетические линии, а также охарактеризовать их фенотипические особенности [Прозоров А.А. et al., 2011; Jagielski et al., 2014].

Основные методом, являющимся первым «золотым стандартом» филогенетической идентификации *M. tuberculosis* является метод определения длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Метод основывается на оценке числа копий и различий в локализации инсерционного элемента *IS6110* [Embden Van et al., 1993]. Недостатком RFLP метода является его низкая воспроизводимость в различных лабораториях, а также необходимость большого количества высококачественной ДНК [Coscolla et al., 2014].

Исходя из описанных ранее ограничений, приоритетной задачей стала разработка методики генотипирования, основанная на ПЦР. Такими методами стали: Сполиготипирование и MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repeat Units) [Jagielski et al., 2014].

Сполиготипирование основывается на детектировании наличия или отсутствия 43 уникальных регионов, находящихся между прямыми повторами в CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats regions) генома *M. tuberculosis*.

Метод генотипирования MIRU классифицирует различные штаммы по повторам различных локусов - Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs).

Недостатком данных методик типирования *M. tuberculosis* и разделения на определенные филогенетические группы является склонность данных молекулярных маркеров к конвергентной эволюции, то есть из-за высокой скорости мутации и изменения маркерных последовательностей изоляты с одними и теми же профилями MIRU-VNTR и Сполиготипирования могут в

реальности относиться к различным филогенетическим линиям [Jagielski et al., 2014].

Поэтому для более точной классификации потребовалось найти новые филогенетические маркеры. Ими стали консервативные у близкородственных видов однонуклеотидные замены (SNPs) в генах, позволяющие выделять из существующих филогенетических линий отдельные сублинии [Homolka et al., 2012]. Исходя из принципа SNP – маркер линии, стало возможным разработка алгоритма генотипирования, представленного на Рисуноке 1.1.

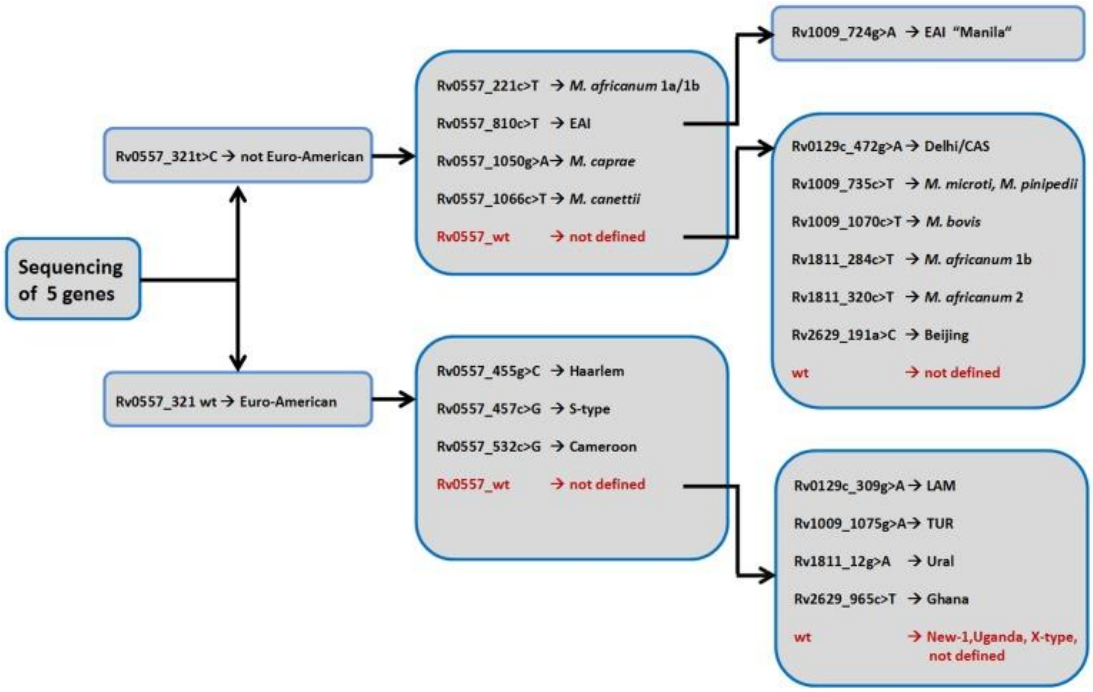


Рисунок 1.1. Последовательный алгоритм классификации клинических изолятов на 17 различных генотипов и основных филогенетических групп [Homolka et al., 2012].

В дополнение к системе генотипирования разработанной *Homolka* и др. [Homolka et al., 2012], существует ряд других методик, в том числе, с использованием систем генов токсин-антитоксин II типа [Zaychikova et al., 2015]. Последний подход имеет принципиальную новизну, так как использует для проведения генотипирования мутации в функционально значимых генах, участвующих в формировании персистенции, толерантности и вирулентности у *M. tuberculosis* [Прозоров et al., 2010; Zaychikova et al., 2015]

1.2. Методы диагностики туберкулеза

Наиболее распространенным в мире методом первичной диагностики туберкулезной инфекции является проведение рентгенографического или флюорографического анализа. Также среди современных методов можно выделить метод магнитно-резонансной томографии. Три данных метода позволяют выявить туберкулез на поздних стадиях развития, так как они детектируют изменения в тканях и органах пациента. Данные тесты являются важными для контроля распространения и анализа эпидемиологической ситуации. В России флюорографическое обследование грудной клетки является обязательным ежегодным мероприятием для пациентов, наблюдающихся у врачей-терапевтов (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 декабря 2012 г. N 1011н г. Москва "Об утверждении Порядка проведения профилактического медицинского осмотра").

При попадании потенциального пациента в группу риска (например, высокая вероятность контакта с больным туберкулезом, нахождение в тюрьмах и др.), а также при наличии у лечащего врача подозрения на возникновение заболевания, могут применяться другие методы диагностики туберкулеза.

На сегодняшний день, самым распространенным методом диагностики туберкулеза является микробиологическое исследование пораженных органов и тканей, а именно посев на селективные среды с последующим микроскопическим анализом. Кроме того, используются разработанные коммерческие наборы для выявления и характеристики лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза [Lonnroth, Knut; WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Recommendations for investigating contacts of persons with infectious tuberculosis in low-and middle-income countries]. Современные методы диагностики и характеристики возбудителя туберкулеза делятся на четыре категории:

1.2.1. Метод микрокопирования окрашенного образца и культуральные методы

Метод микроскопирования окрашенного образца является наиболее простым и распространенным способом детекции. Осуществляется окрашивание мазка методом Циля-Нильсена в течение нескольких часов [Ellis et al., 1993]. Чувствительность данного метода составляет 20-60%. Модернизацией метода является флуоресцентная микроскопия с использованием флуорохрома и светоизлучающего диода [Steingart et al., 2006]. Этот метод увеличивает точность тестирования на 10%.

Метод посева на твердую селективную или жидкую среду, также, является самым надежным и простым методом выявления патогена. Традиционно, для посева используют среду Lowenstein-Jensen, которая обеспечивает рост микобактерий в течение 4-8 недель. Данный метод является референтным и позволяет определить наличие возбудителя в мазке.

Выращивание культуры в жидкой среде позволяет провести анализ с использованием автоматизированной системы BACTEC или MB/BacT (bioMerieux, USA) и пробирки-индикатора роста микобактерий MGIT (mycobacterial growth indicator tube) [Cruciani et al., 2004; Pfyffer et al., 1997]. Результат исследования становится доступным через 4-13 дней после начала теста, а чувствительность данного метода составляет 92% - 94,7% от исследуемых образцов [Pfyffer et al., 1997].

1.2.2. Молекулярные методы диагностики

На сегодняшний день методы амплификации нуклеиновых кислот является обще используемым и наиболее точным методом диагностики и характеристики туберкулеза. Существует множество различных систем, использующих разные методы для проведения детекции: ПЦР в реальном времени: CobasTaqMan MTB test [Aono et al., 2009], Abbott RealTime MTB (Abbott, USA) [Andersen et al., 1989;

Thierry et al., 1990], AMTD (Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct test, Gen-Probe, USA) и BD ProbeTec ET [Mak et al., 2012]; полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), секвенирование ДНК и другие. Данные методы детекции являются наиболее быстрыми (1-5 дней) и высокоточными (чувствительность и специфичность ~100%).

По сравнению с традиционным методами посева молекулярные методы позволяют проводить точную и быструю оценку свойств патогена, что является критически важным для больных туберкулезом с ВИЧ инфекцией [Leylabadlo et al., 2016].

1.2.3. Методы Масс-спектрометрии и ИФА-γ тест

Впервые метод масс-спектрометрии был использован для идентификации бактерий в 1970-х годах [Seng et al., 2010]. На сегодняшний день существует система идентификации микобактерий методом масс-спектрометрии - MALDI-TOF MS. Данный метод основан на идентификации профиля белков микобактерий и позволяет провести обнаружение микобактерий туберкулеза за 24 часа с чувствительностью до 98,3% [Croxatto et al., 2012; Jiang et al., 2006]. Помимо этого, данный метод позволяет детектировать определенные мутации в генах, приводящие к возникновению лекарственной устойчивости [Jiang et al., 2006].

Тест ИФА-γ тест (Interferon (IFN)-γ release assays, IGRAs) пришел на смену классическому кожному тесту - реакции Манту или Диаскин тесту, основанные на выявлении PPD (purified protein derivative) туберкулина – необработанной смеси туберкулиновых белков) и представляет собой анализ Т-лимфоцитов, несущих антиген к *M. tuberculosis* (ESAT-6 и CFP-10). Различные платформы для проведения теста обладают чувствительностью ~81%.

1.2.4. Анализ липоарабиноманнана

Липоарабиноманнан, компонент клеточной стенки микобактерий туберкулеза, является одним из факторов вирулентности и выживаемости при попадании в макрофаги человека [Hunter et al., 1986]. Наличие данного белка - маркер активной формы туберкулеза, который определяется в моче пациента [Minion et al., 2011]. Эффективность данного метода варьируется от 13% у ВИЧ- до 70% у ВИЧ+ пациентов.

Таким образом, современные методы первичной диагностики позволяют, в определенной степени, не только выявить *M. tuberculosis* в организме пациента, но и разделить его на активную и латентную форму, а также определить некоторые аспекты лекарственной устойчивости [Lawn, 2012].

1.3. Противотуберкулезная химиотерапия

При проведении лечения, после обнаружения возбудителя туберкулеза в организме человека, происходит его исследование на предмет лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам. Для этого используют молекулярно-генетические и микробиологические методы [Leylabadlo et al., 2016].

Базовым молекулярно-генетическим методом определения лекарственной устойчивости является коммерческий набор Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), определяющий мутации в гене *rpoB*. Данный метод основан на анализе точек мутации в гене *rpoB*, приводящих к устойчивости к рифампицину [Steingart et al., 2014].

Другим методом для определения лекарственной устойчивости является метод Line probe assay (LiPA), основанный на амплификации участков ДНК, маркерных для устойчивости к рифампицину. В ходе исследования проводится амплификация определенного участка гена *rpoB*, кодирующего β-субъединицу РНК-полимеразы [Morgan et al., 2005].

Также существуют методы определения лекарственной устойчивости к препарату изониазиду. GenoTypeMTBDR*plus* (Hain Life science, Nehren, Germany) – коммерческий набор для диагностики «мутаций устойчивости» к изониазиду и рифампицину. Метод основан на гибридизации ампликонов ДНК с мембран-связанными зондами и последующей мультиплексной ПЦР. Мишенями для амплификации и гибридизации являются гены, мутации в которых приводят к устойчивости к рифампицину – *rpoB* и к изониазиду –*katG* и *inhA* [Bang et al., 2006]. Данный метод, из-за высокой точности >90%, используется как метод сравнения с фенотипическим тестом на лекарственную чувствительность [Wattal et al., 2012].

Классическим же методом на сегодняшний день считается метод определения лекарственной чувствительности с использованием культуры *M. tuberculosis* в жидкой и твердой среде. Одним из современных методов выявления лекарственной чувствительности является технология BACTEC 460 или BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Biosciences, Sparks, MD, USA). Метод позволяет детектировать лекарственную чувствительность к широкому спектру противотуберкулезных препаратов, в том числе к: стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу и пиразинамиду [Rüsch-Gerdes et al., 2006; Scarparo et al., 2004].

Не молекулярно-генетическим методом определения лекарственной чувствительности также является инвертированная микроскопия. Преимуществами метода являются: быстрый рост культуры в жидкой среде по сравнению с ростом на агаризованой среде; возможностью детектирования корд-фактора (трегалоза-димиколат) на ранних стадиях роста культуры; позволяет проводить тестирование на лекарственную чувствительность вместе с детекцией роста бактерий [Moore et al., 2006]. Данный метод является наиболее доступным и быстрым, результат доступен после 7 дней от начала эксперимента.

Для унификации терминологии обозначения фенотипа лекарственной устойчивости существует международная классификация штаммов *M. tuberculosis*:

- Чувствительные – штаммы, чувствительные к действию всех противотуберкулезных препаратов;
- Монорезистентные – штаммы, устойчивые к одному из противотуберкулезных препаратов;
- Полирезистентные:
  - МЛУ – штаммы устойчивые к изониазиду и рифампицину;
  - ШЛУ – штаммы устойчивые к изониазиду, рифампицину, любому представителю фторхинолонов и, как минимум, к одному из инъекционных препаратов второго ряда противотуберкулезной химиотерапии.

В дополнение к ним предлагается введение нового термина ТЛУ – тотальная лекарственная устойчивость – устойчивость ко всем препаратам первого и второго ряда противотуберкулезной химиотерапии [Müller et al., 2013].

Современный курс противотуберкулезной химиотерапии предполагает использование 22 препаратов, входящих в три группы лекарств, Таблица 1.2.

Таблица 1.2. Препараты противотуберкулезной химиотерапии [WHO., 2015].

Препараты первого ряда		
Название лекарства	Обозначение*	Группа
Изониазид	INH (H)	Гидразиды
Рифампицин	RMP (R)	Ансамицины
Пиразинамид	PZA (Z)	Пролекарства, синтетические препараты
Этамбутол	EMB (E)	
Стрептомицин	SM (S)	Аминогликозиды
Препараты второго ряда		
Циклосерин	C	
Офлоксацин	OFX (Of)	Фторхинолоны
Ципрофлоксацин	CIP (Cf)	
Амикацин	AMK (A)	Аминогликозиды
Канамицин	KM (K)	
Капреомицин	CAP (Cp)	Гликопептиды
Протионамид	Pt	Синтетические антибактериальные препараты, производные изоникотиновой кислоты
Этионамид	Et	
ПАСК-парааминосалициловая кислота	PAS	Синтетические препараты
Препараты резервного ряда		
Рифабутин	Rb	Ансамицины
Клофазимин	Clo	
Кларитромицин	CLR (Cl)	Макролиды и азалиды
Амоксициллин	Am	Полусинтетические пенициллины
Фтивазид	Ph	Гидразиды
Флуренизид	Fl	Производное изоникотиновой кислоты
Флоримицин	F	Синтетические антибактериальные препараты
Тиоцетазон	T	
Бедаквилин	BDQ	Синтетические препараты

* - Далее в работе, для обозначения антибиотиков, будут использованы трех- или однобуквенные сокращения.

Для лечения туберкулеза используется несколько схем лечения, основанных на использовании вышеописанных препаратов. В России для лечения впервые выявленного туберкулеза, сопровождающегося бактериовыделением и/или поражением различных органов и тканей, применяется стандартная, четырехкомпонентная схема: изониазид, рифампицин, пиразинамид и стрептомицин или этамбутол. Далее при сохранении бактериовыделения проводится анализ на лекарственную чувствительность изолята *M. tuberculosis* (или другого возбудителя) и назначается новая схема химиотерапии, исходя из результатов теста. Также существуют схемы, использующие дополнительно фторхинолоны или препараты из резервного ряда (Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 N 109 (ред. от 29.10.2009) "О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации").

Глава 2. Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis*, природная и приобретенная

2.1. Лекарственная устойчивость

По оценкам ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения) доля штаммов *M. tuberculosis*, характеризующихся наличием лекарственной устойчивости, растет. Как правило, распространение лекарственно устойчивых штаммов *M. tuberculosis* связано с тремя причинами: слабое развитие диагностики и своевременного выявления опасных форм туберкулеза, недостаточный эпидемиологический контроль, а также миграция, в том числе, из стран СНГ в Российскую Федерацию [Прозоров et al., 2012; WHO., 2015] (Рисунок. 2.1).

Развитие лекарственной устойчивости у микобактерий, в основном, связано с мутациями в генах мишенях лекарств или связанных с ними генах. Стоит отметить, что представители микобактерий туберкулезного комплекса являются генетически мономорфными, с высоким уровнем идентичности геномов (>99,95%) и характеризуются ограниченным горизонтальным переносом генов, а

также клональной структурой популяции [Achtman, 2008; Alland et al., 2003] [Achtman, 2008; Alland et al., 2003]. В частности, для *M. tuberculosis* механизм горизонтального переноса генов пока не исследован [Boritsch et al., 2016].

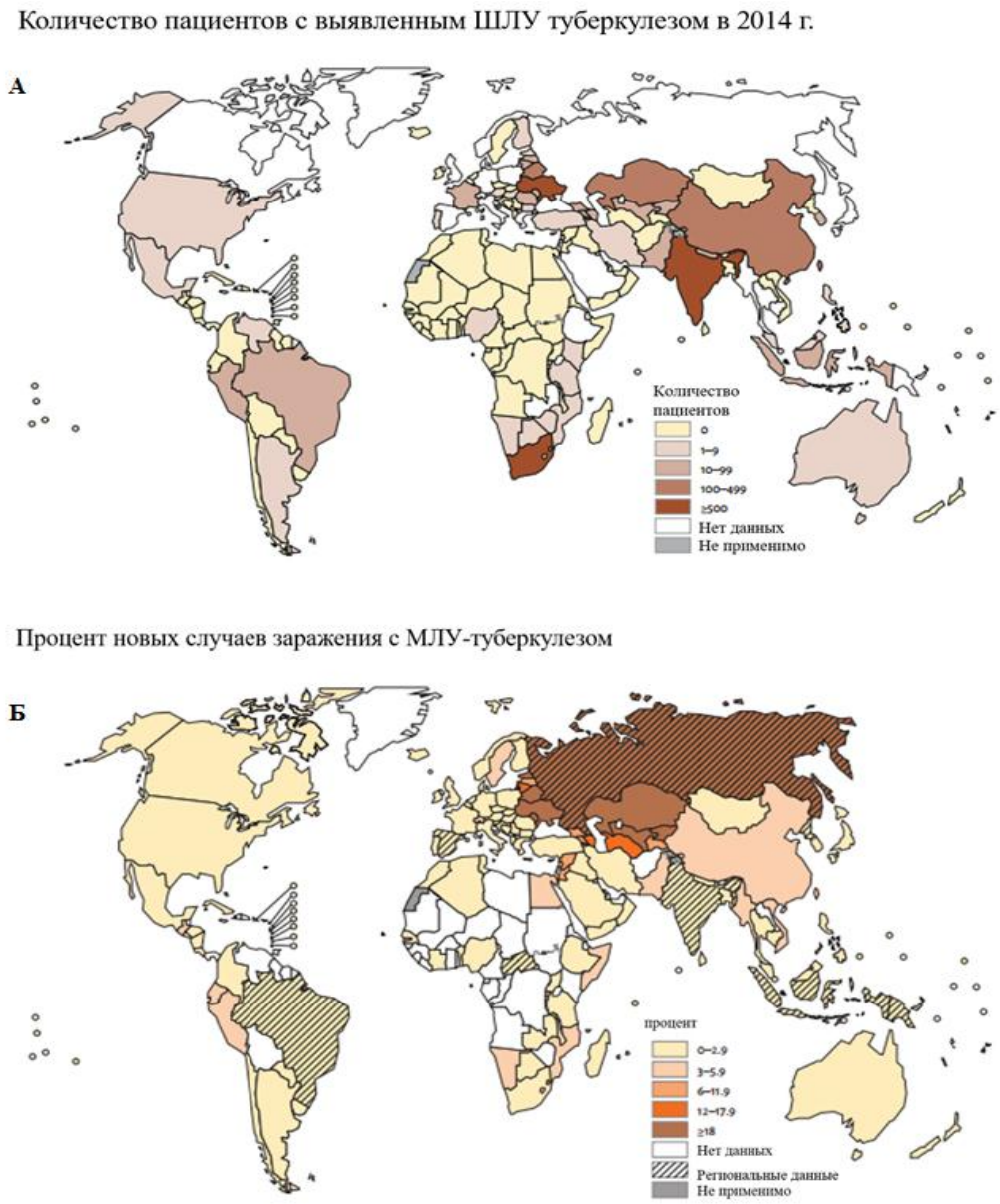


Рисунок 2.1. Данные заболеваемости туберкулезом с выявленной лекарственной устойчивостью в 2015 и 2014 годах. Наиболее опасная ситуация складывается в странах бывшего СССР, а также в развивающихся странах. Также выявление МЛУ (1.А) и ШЛУ (1.Б) форм в развитых странах (США, страны ЕС связано, прежде всего, с миграцией из других стран [WHO., 2015]).

2.2. Приобретенная лекарственная устойчивость

Устойчивость, возникшая в результате отбора под действием лекарств, называется – приобретенной. Она характерна для изолятов *M. tuberculosis*, ранее подвергавшихся действию противотуберкулезных препаратов. Такая лекарственная устойчивость напрямую является первопричиной возникновения МЛУ и ШЛУ штаммов *M. tuberculosis*.

2.2.1. Устойчивость к рифампицину

Антибиотик рифампицин – полусинтетический антибиотик, относящийся к группе рифамицина. Применяется для лечения туберкулеза и лепры, а также действует на другие грамм-положительные бактерии. В отношении грамм-отрицательных бактерий рифампицин менее эффективен. Лекарственная устойчивость к рифампицину в основном (95% от всех RIF^r изолятов) происходит в результате мутаций в определенном участке гена β-субъединицы ДНК-зависимой РНК полимеразы *rpoB* – рифампициновом кармане (регионе, определяющим устойчивость к рифампицину (RRDR, rifampicin-resistance determining region (81 п.о.) [Andre et al., 2017]). Мутации устойчивости в гене *rpoB* влияют на функцию белка [Abdelaal et al., 2009; Koch et al., 2014] (Таблица 2.1).

2.2.2. Устойчивость к изониазиду

Изониазид (изокотинила гидразид) – антибиотик первого ряда противотуберкулезной химиотерапии и является про-лекарством. Изониазид используется для лечения как латентного, так и активного туберкулеза [Nahid et al., 2016]. Около 60-70% устойчивых к изониазиду штаммов *M. tuberculosis* являются мутантами по гену *katG*, кодирующим каталазу-пероксидазу - активатор лекарства, в позиции S315T [Brossier et al., 2016; Zhang et al., 1992a].

Кроме того, устойчивость к изониазиду проявляется в результате мутаций в гене *inhA*, продукт которого участвует в биосинтезе миколовой кислоты [Vilchèze et al., 2006], как в структурной, так и в промоторной области гена *inhA* [Larsen et al., 2002], а также в гене бета-кетоацил-ACP-синтетазы KasA, участвующей в элонгации жирных кислот. Ее инактивация приводит к накоплению предшественников насыщенных жирных кислот [Mdluli et al., 1998] (Таблица 2.1).

2.2.3. Устойчивость к фторхинолонам

Широкая лекарственная устойчивость характеризуется устойчивостью к изониазиду и рифампицину, а также к любому представителю антибиотиков класса фторхинолонов и одному из инъекционных препаратов второго ряда противотуберкулезной химиотерапии (амикацин, канамицин, капреомицин и др.) [WHO 2015].

Антибиотики группы фторхинолонов являются одними из самых назначаемых антибиотиков в мире при лечении туберкулеза. Первый антибиотик группы хинолонов, был синтезирован в 1962 году и использован в клинике уже 1967 для лечения заболеваний, вызванных грамм-отрицательными бактериями. Хинолоны – синтетические вещества, с большим потенциалом для создания производных и модификаций химической структуры [Mayer et al., 2014].

После присоединения к структурам хинолонов атомов фтора, появился отдельный класс веществ – фторхинолоны. Фторхинолоны можно разделить на две группы [Mayer et al., 2014]:

1) старые: ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин и пефлоксацин;

2) новые: левофлоксацин, спарфлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин и гемифлоксацин.

Мишенями фторхинолонов являются топоизомеразы II типа. Белки топоизомераз необходимы для реализации топологии комплекса ДНК-Белок при репликации, транскрипции и рекомбинации, и осуществляют введение

двухцепочечных разрывов для распутывания петель ДНК [Champoux, 2001]. Бактериальные клетки как правило содержат два класса топоизомераз II типа: ДНК-гираза и топоизомераза IV, но у *M. tuberculosis* существует только ДНК-гираза, которая является единственной мишенью для фторхинолонов и кодируется двумя генами *gyrA* и *gyrB* [Khisimuzi Mdluli et al., 2007; Mayer et al., 2014]. Чаще всего мутации устойчивости к фторхинолонам происходят в регионе QRDR (quinolone-resistance-determining region) гена GyrA [Takiff et al., 1994] и намного реже в QRDR регионе GyrB [Pestova et al., 2000] (Таблица 2.1).

2.2.4. Устойчивость к стрептомицину

Стрептомицин является первым антибиотиком, который был использован для лечения туберкулеза и является природным антибиотиком, обнаруженным у *Streptomyces globisporus streptomycini* и родоначальником класса антибиотиков – аминогликозидов [Singh et al., 1954]. Стрептомицин также широко применялся для лечения чумы, туляремии и других бактериальных заболеваний.

Стрептомицин оказывает влияние на процесс синтеза белка. Стрептомицин связывается с 16S субъединицей рибосомы, ингибируя трансляцию и как следствие синтез белка. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к стрептомицину, обнаружены в гене 16S рРНК (*rrs*) и рибосомального белка S12, кодируемого геном *rpsL* [Sreevatsan et al., 1996]. Низкий уровень устойчивости к стрептомицину, также возникает из-за появления мутации в гене *gidB*, кодирующем консервативную 7-метил-гуанозин-метилтрансферазу, специфичную для 16S рРНК [Wong et al., 2011] (Таблица 2.1).

2.2.5. Устойчивость к канамицину

Канамицин (Канамицин А) - природный антибиотик класса аминогликозидов, выделенный у *Streptomyces kanamyceticus* [Lawrence Paul Garrod et al., 1968].

Канамицин, как представитель антибиотиков класса аминогликозидов, действует на те же мишени что и стрептомицин, но устойчивость к нему достигается за счет других мутаций в генах *rrs* и *rpsL* [Alangaden et al., 1998] (Таблица 2.1).

Несмотря на то, что стрептомицин имеет ту же мишень, эффективность действия канамицина отличается от стрептомицина благодаря его химической структуре [Heifets et al., 1989].

2.2.6. Устойчивость к пиразинамиду

Пиразинамид является препаратом I ряда противотуберкулезной химиотерапии, направленным на лечение как чувствительных, так и МЛУ штаммов *M. tuberculosis* [Heifets et al., 1992]. Преимуществом данного лекарства является способность влиять на дормантные клетки, персистирующие в кислой среде макрофагов [Mitchison, 1985].

Пиразинамид является про-лекарством, структурным аналогом никотинамида, и для осуществления своей функции должен преобразоваться в пиразиновую кислоту (POA) с помощью фермента пиразинамидазы, кодируемой геном *pncA* [Scorpio et al., 1996]. Было обнаружено, что около 97% всех случаев пиразинамид-устойчивости обусловлено мутациями в гене *pncA* [Hirano et al., 1997]. В работе [Shi et al., 2011] установлена мишень пиразиновой кислоты – рибосомальный белок S1, кодируемый геном *rpsA*, вовлеченный в процессы трансляции и транс-трансляции при спаривании субъединиц рибосомы. Пиразиновая кислота связывается с 30S рибосомальным белком S1 и ингибирует процесс транс-трансляции, который необходим для синтеза белка. [Njire et al., 2016]. Именно мутации в гене *rpsA*, приводили к образованию 3% пиразинамид-устойчивых изолятов *M. tuberculosis*. Также за осуществление устойчивости к пиразинамиду отвечают мутации в гене *panD* [Zhang et al., 2013], кодирующем

пантоат-β-аланин [Dillon et al., 2014], и, возможно, в гене *hadC* (β-гидроксиацил-ацил дегидратаза транспортер) [Zhang et al., 2013].

2.2.7. Устойчивость к сиртуро/бедаквилин/TMC207

Бедаквилин – это синтетический антибиотик, относящийся к группе диарилхинолонов (не связан с фторхинолонами). Интересной особенностью данного препарата является то, что это первое лекарство за 40 лет существования противотуберкулезной терапии с принципиально новой мишенью. Активность препарата направлена на ингибирование микобактериальной АТФ-синтазы (основной мишенью была установлена С-субъединица F_1F_O-АТФ-синатазы (ген *atpE*), а также ε субъединица F_1F_O-АТФ-синатазы (ген *atpC*) [Andries et al., 2005; Biukovic et al., 2013]. Препарат, после прохождения клинических испытаний стал доступным в 2012 году и включен в список препаратов 2 ряда противотуберкулезной химиотерапии [Deoghare, 2013].

Несмотря на столь не продолжительный период использования бедаквилина, уже известны механизмы устойчивости к данному препарату. Существует доказанный механизм устойчивости, реализующийся через мутации в гене *atpE* [Segala et al., 2012] и с помощью гена *Rv0678*, регулирующего экспрессию клеточного транспортера MmpS5-MmpL5 [Andries et al., 2014; Hartkoorn et al., 2014]. Стоит также отметить, что появление различных мутаций в непосредственной мишени лекарства приводит к повышению МИК бедаквилина в 8-133 раза, а появление мутаций в системе клеточного транспортера MmpS5-MmpL5 всего в 2-8 раз [Andries et al., 2014; Pym et al., 2016].

Гены, описанные в данном разделе, а также гены, чьи продукты вовлечены в реализацию приобретенной лекарственной устойчивости, приведены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Гены участвующие в реализации приобретенной лекарственной устойчивости [Nguyen, 2016]

Ген	**Белок**	**Участие в лекарственной устойчивости**	**Целевой антибиотик**	**Принцип действия лекарства**
katG	Каталаза-пероксидаза	Активация пролекарства	Изониазид	Ингибирование биосинтеза миколовых кислот и других метаболических процессов
inhA	Еноил-ACP редуктаза	Мишень		
ndh	НАД(Н) дегидрогеназа II	Модуляция соотношения НАД(Н)/НАД		
ahpC	Алкил-гидропероксидаза	Устойчивость к оксидативному стрессу		
rpoB	β-субединица РНК-полимеразы	Мишень	Рифампицин	Ингибирование транскрипции
pncA	Пиразинамидаза	Активация пролекарства	Пиразинамид	Ингибирование транс-трансляции
rspA	S1 рибосомальный белок	Мишень		
embCAB	Арабинозилтрансферазы	Мишень	Этамбутол	Ингибирование синтеза арабиногалактана
embR	Регулятор транскрипции *embCAB*	Регулятор экспрессии *embCAB*		
rpsL	S12 рибосомальный белок	Мишень	Стрептомицин	Ингибирование синтеза белка
rrs	16S рРНК	Мишень		
gidB	16S рРНК метилтрансфераза	Модификация мишени		
whiB7	МЛУ	Регуляция экспрессии генов		

	транскрипционный фактор	лекарственной устойчивости		
rrs	16S рРНК	Мишень	Амикацин/Канамицин	Ингибирование синтеза белков
eis	Аминогликозид-ацетилтрансфераза	Инактивация лекарств		
whiB7	МЛУ транскрипционный фактор	Регуляция экспрессии *eis*		
ethA	Флавин монооксигеназа	Активация пролекарства	Этионамид	Ингибирование биосинтеза миколата
ethR	Репрессор транскрипции *ethA*	Регуляция экспрессии *ethA*		
inhA	Еноил АСР редуктаза	Мишень		
ndh	НАД(Н) дегидрогеназа II	Модуляция соотношения НАД(Н)/НАД		
mshA	Гликозилтрансфераза	Активация пролекарства		
gyrA	А-субъединица ДНК-гиразы	Мишень	Фторхинолоны	Ингибирование ДНК гиразы
gyrB	В-субъединица ДНК-гиразы	Связывание с лекарством		
alrA	D-аланин рацемаза	Мишень	D-Циклосерин	Ингибирование синтеза пептидогликана
cycA	D-аланин-D-аланин лигаза	Мишень		
ddl	Транспортер	Выброс лекарства		

	аминокислот			
thyA	Тимидилатсинтаза А	Синтез dTTP	*p*-Аминосалициловая кислота (ПАСК)	Ингибирование биосинтеза фолатов
dfrA	Дигидрофолат редуктаза	Мишень		
folC	Дигидрофолат синтаза	Активация пролекарства		
ribD	Дигидрофолат редуктаза (аналог)	Перенос мишени лекарства		
tlyA	рРНК метилтрансфераза	Защита рибосом	Капреомицин	Ингибирование синтеза белка
rrs	16S рРНК	Мишень		
atpE-C	с и ε субъединица F1FO-АТФ-синатазы	Мишень	Бедаквилин	Нарушение структуры белка
Rv0678	Оперонный репрессор	Транспорт лекарства		

2.3. Природная лекарственная устойчивость

Помимо приобретенной лекарственной устойчивости, возникающей вследствие мутационных изменений структур белков-мишеней, *M. tuberculosis* обладает системой генов природной лекарственной устойчивости – резистомом. Резистом является древней системой направленной на нейтрализацию токсического действия химических соединений из окружающей среды, доставшийся патогену от его почвенных предков [Morris et al., 2005]. Наличие подобных систем, вдобавок к приобретенной, создает большую проблему для подбора условий лечения, а также для создания новых эффективных лекарств. Ниже подробно описаны системы, обеспечивающие природную лекарственную устойчивость *M. tuberculosis* и других патогенных бактерий.

2.3.1. Белки модификаторы мишеней

Одной из стратегий, которую используют бактерии, для снижения или предотвращения повреждений, вызванных попаданием лекарств в клетку, является модификация белков - мишеней. Этот механизм широко используется *M. tuberculosis* и другими патогенами для снижения эффективности связывания макролидов и линкозамидов с рибосомами. Эти антибиотики связываются со специфичным сайтом в 50S субъединице бактериальной рибосомы и, таким образом, ингибируют транслокацию пептидил-тРНК [Buriánková et al., 2004]. При наличии такого рода супрессии снижается скорость синтеза белков и, как следствие, рост культуры. Микобактерии, включая *M. tuberculosis* и *M. bovis,* являются устойчивыми к макролидам и линкозамидам, но штамм *M. bovis* BCG (Bacillus of Calmette and Guérin), полученный Пастером из *M. bovis*, является чувствительным к действию данных веществ. С помощью сравнительного биоинформатического анализа

было выявлено, что такого рода чувствительность вызвана делецией гена *erm37* (*rv1988*) [Buriánková et al., 2004]. Ген *erm37* кодирует рибосомальную РНК-метилтрансферазу, локализующуюся внутри большого хромосомного локуса RD2 (Region of Difference 2), который отсутствует у *M. bovis* BCG. При введении данного гена в клетки *M. bovis* BCG устойчивость к макролидам и линкозамидам восстанавливается путем метилирования 23S рРНК [Madsen et al., 2005]. Гены семейства *erm*, также были обнаружены и у других членов рода *Mycobacterium*: *M. smegmatis* и *M. fortuitum* [Nash, 2003; Nash et al., 2005]. Данные исследований показали, что функцией Erm37 и подобных метилтрансфераз является осуществление устойчивости к макролидам и линкозамидам у микобактерий. Также было обнаружено, что Erm37 вовлечен в осуществление эпигенетических механизмов контроля экспрессии генов макрофагов хозяина. Данный белок, секретируемый клетками *M. tuberculosis*, был обнаружен внутри ядра макрофагов, где он производил метилирование гистонов H3 в $H3R_{42}$, репрессируя экспрессию генов, вовлеченных в первичный ответ макрофага [Yaseen et al., 2015]. Данный пример вовлеченности генов лекарственной устойчивости в осуществление вирулентности является причиной для изучения генных сетей взаимодействия патоген-хозяин, как целостной взаимосвязанной системы.

Подобный механизм устойчивости реализуется и в отношении капреомицина и виомицина, которые широко используются при лечении МЛУ форм туберкулеза. В геномах *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* картировали мутации устойчивости в гене *tlyA*, который кодирует 2′-*O*-метилтрансферазу, чья активность коррелирует с устойчивостью к капреомицину и виомицину. TlyA метилирует обе 16S и 23SрРНК в двух нуклеотидных позициях C_{1409} и C_{1920}, что приводит к устойчивости к капреомицину и виомицину [Johansen et al., 2006; Maus et al., 2005].

2.3.2 Белки деградации лекарств

Другим способом защиты микобактерий от действия антибиотиков является их деградация с помощью ферментов. Данный механизм хорошо изучен на примере β-лактамных антибиотиков, которые не оказывают никакого существенного влияния на клетки *M. tuberculosis*. Эти антибиотики ингибируют пенициллин-связывающие белки (ПСБ), необходимые для сборки пептидогликанной цепи. Таким образом β-лактамные антибиотики препятствуют синтезу клеточной стенки и, как следствие, приводят к гибели клетки. В геноме *M. tuberculosis* насчитывается как минимум четыре основных ПСБ и все они связываются с β-лактамными антибиотиками в клинически достижимых концентрациях [Chambers et al., 1995]. Эти данные свидетельствуют о том, что устойчивость к антибиотикам не достигается за счет низкой аффинности мишени к антибиотику и, таким образом, одним из главных механизмов устойчивости к β-лактамным антибиотикам является низкая проницаемость клеточной стенки.

Однако длительный период роста клеток *M. tuberculosis* играет и отрицательную роль в обеспечении лекарственной устойчивости к β-лактамным антибиотикам. Продолжительное воздействие антибиотиком и, как следствие, его накопление в клетке может в итоге привести к снижению скорости деления бактерий [Watt et al., 1992].

Фактором активной защиты клеток *M. tuberculosis* от воздействия β-лактамных антибиотиков являются ферменты – β-лактамазы, гидролитические ферменты, которые осуществляют гидролиз β-лактамного кольца антибиотика [Chambers et al., 1995]. Однако, в силу того что клеточная стенка микобактерий является плохо проницаемой для β-лактамных антибиотиков и скорость их накопления крайне мала - активность микобактериальных β-лактамаз намного ниже, чем у других патогенных бактерий [Jarlier et al., 1991].

Белок BlaC является наиболее значимой β-лактамазой у *M. tuberculosis* [Voladri et al., 1998; Wang et al., 2006]. Благодаря своему большому и пластичному субстрат-связывающему домену [Wang et al., 2006], BlaC обладает широкой субстрат-специфичностью, включающей карбопенемы, обычно устойчивые к действию β-лактамаз [Tremblay et al., 2010]. Существующие ингибиторы β-лактамаз, например клавулановая кислота, являются слабоэффективными против гидролазы BlaC, по сравнению с другими гидролазами этого же класса. Экспрессия *blaC M. tuberculosis* контролируется β-лактам-зависимым транскрипционным репрессором BlaI (winged-helix). В отсутствие β-лактамных антибиотиков, BlaI образует гомодимеры, которые связываются с промотором гена *blaC*, ингибируя его транскрипцию [Sala et al., 2009]. При попадании антибиотика в клетку *M. tuberculosis*, BlaI диссоциирует от ДНК-связывающего сайта и таким образом начинается экспрессия гена *blaC* [Sala et al., 2009].

В дополнение к BlaC у *M. tuberculosis* обнаружено еще как минимум три дополнительные β-лактамазы: BlaS, Rv0406c и Rv3677c, обеспечивающие, по-видимому, еще более низкий уровень устойчивости к β-лактамным антибиотикам [Flores et al., 2005; Nampoothiri et al., 2008].

2.3.3. Белки модификаторы лекарств

Представители рода *Mycobacterium* обладают способностью обезвреживать антибиотики, модифицируя их химическую структуру.

Для лечения МЛУ туберкулеза широко используются аминогликозидные антибиотики - канамицин и амикацин, представители второго ряда препаратов. Устойчивость к данным антибиотикам является одним из признаков наличия ШЛУ у выявленного штамма *M. tuberculosis*. Мишенью действия аминогликозидных антибиотиков является система синтеза белка (см. Разделы 2.2.4, 2.2.5).

Природная лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* к аминогликозидным антибиотикам осуществляется с помощью белка ацетилтрансферазы Eis (enhanced intracellular survival) [Zaunbrecher et al., 2009]. Данный белок был впервые описан как фактор, препятствующий первичному ответу макрофага на проникновение в него *M. tuberculosis*. Eis секретируется *M. tuberculosis* в цитозоль инфицированного макрофага, где ацетилирует фосфатазу MKP7, регулирующую фосфорилирование протеинкиназы JNK и P38 MAPK пути. Такое влияние на сигнальные пути зараженного макрофага супрессирует иммунный ответ на микобактериальную инфекцию, а именно аутофагию, воспаление и апоптоз [Kim et al., 2012].

Биохимические исследования показали, что Eis ацетилирует аминогруппы аминогликозидов с помощью ацетил-CoA, донора ацетильной группы, и таким образом инактивирует антибиотики [Chen et al., 2011]. Также в последних исследованиях было показано, что помимо устойчивости к аминогликозидам, Eis определяет устойчивость и к капреомицину [Houghton et al., 2013].

2.3.4. Белки молекулярной мимикрии

На сегодняшний день, молекулярная мимикрия является особенной чертой микобактерий, которая позволяет нейтрализовать такие антибиотики как фторхинолоны и другие синтетические антибиотики, широко используемые при лечении туберкулеза [Duncan et al., 2004]. Фторхинолоны являются бактерицидными веществами, которые убивают клетку путем ингибирования репликации, репарации и транскрипции ДНК. Как было описано в разделе 2.2.3 эти антибиотики связываются с ДНК-гиразой или топоизомеразой в их комплексе ДНК-белок и тем самым предотвращают разрывы ДНК, препятствуя раскручиванию цепей ДНК. Таким образом

происходит деградация молекулы ДНК и как следствие гибель клетки [Andriole, 2005].

С другой стороны, природная лекарственная устойчивость к фторхинолонам обусловливается белком MfpA. При исследовании устойчивости *M. smegmatis* и *M. bovis* к антибиотикам группы фторхинолонов была показана корреляция между уровнем экспрессии гена данного белка и возникновением лекарственной устойчивости к фторхинолонам [Montero et al., 2001]. Аминокислотная последовательность MfpA содержит пентапептидные повторы, в которых каждая пятая аминокислота является лейцином или фенилаланином. При проведении исследований по изучению 3D структуры данного белка было обнаружено, что его структура очень похожа на спираль ДНК [Ferber, 2005; Hegde et al., 2005], Рисунок 2.2.

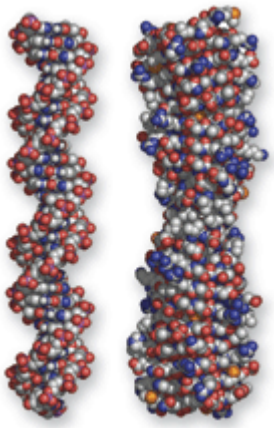


Рисунок 2.2 3D структура белка MfpA (справа) и двухцепочечная структура ДНК (слева) [Ferber, 2005].

Предполагается, что из-за сходства в структурной организации белка и ДНК, MfpA становится основной мишенью для фторхинолонов [Ferber, 2005].

2.3.5. Системы токсин-антитоксин

Системы токсин-антитоксин (ТА) являются важными генетическими системами у бактерий и архей и состоят из белкового комплекса, включаещего

в себя стабильный белок токсина и менее стабильный антитоксин [Yamaguchi et al., 2011]. Оба компонента представляют из себя комплекс, в котором активность токсина ингибируется антитоксином.

При определенных условиях, например, при стрессе, вызванным антибиотиком, лабильный белок антитоксина деградирует быстрее и активного белка токсина, что негативно влияет на трансляцию, репликацию, синтез АТФ и образование клеточной стенки [Mutschler et al., 2011; Unoson et al., 2008]. Таким образом, функциональное значение систем ТА в клетках *M. tuberculosis* сводится к адаптации клетки к стрессам, в том числе вызванным антибиотиками, и перевод клеток в дормантное состояние, в котором у них практически останавливается метаболизм и, таким образом, они становятся толерантными (не восприимчивыми) к действию антибиотиков (антибиотик действуя на свою мишень, не влияет на жизнеспособность «спящей» бактерии) [Singh et al., 2010].

В геноме *M. tuberculosis* обнаружено более 80 ТА систем. Большинство из них относится к системе ТА II типа [Zaychikova et al., 2015]. Среди них можно выделить: YefM/YoeB$_{Mt}$ (1 система), RelBE$_{Mt}$ (2 системы), ParDE$_{Mt}$ (2 системы), HigBA$_{Mt}$ (3 системы), ТАС (ТА шаперон): SecB-like (1 система), MazEF$_{Mt}$ (10 систем) и VapBC$_{Mt}$ (50 систем). Все они ассоциированы с персистирующим состоянием клеток и латентной формой туберкулеза и, как следствие, с невосприимчивостью к большинству противотуберкулезных антибиотиков [Han et al., 2010].

Как и в клетках *M. tuberculosis* в геномах МТК также существуют системы ТА, участвующие в клеточной адаптации к стрессам и антибиотикотолерантности [Gupta, 2009].

Таким образом, система ТА является важнейшей системой обеспечения выживаемости клеток в условиях воздействия различных внеклеточных стрессов и перевод клеток в дормантное состояние. Исследование функционирования систем ТА является важной задачей для поиска новых

мишеней и лекарств для борьбы с латентной инфекцией [Albrethsen et al., 2013].

2.3.6. Белки клеточного транспорта

Наиболее распространенный способ защиты у патогенных микроорганизмов от проникающих внутрь клетки антибиотиков является их обратный транспорт, осуществляемый клеточными транспортерами [Liu et al., 2014]. В физиологическом отношении эти белки часто не являются специализированными для транспорта антимикробных агентов. В основном их прямой функцией является транспорт питательных веществ, отходов жизнедеятельности клетки, токсинов или сигнальных молекул. Способность транспортеров выводить антибиотики является вторичной и не специфичной. В качестве примера можно привести белки транспорта *E. coli*: 20 из 36 белков клеточного транспорта обеспечивают низкий уровень лекарственной устойчивости к одному или более антибиотикам [Nishino et al., 2001]. Таким образом, маловероятно, что все 20 транспортеров исходно образовались как медиаторы лекарственной устойчивости.

У представителей рода *Mycobacterium* обнаружено как минимум 18 белков-транспортеров, которые определены как транспортеры антибиотиков, дающие низкий уровень устойчивости [Viveiros et al., 2012].

В развитии лекарственной устойчивости, определяемой клеточными транспортерами, бактерии использует многочисленные механизмы транскрипционного регулирования экспрессии клеточных транспортеров. Транспортер *E. coli* AcrB выполняет широкий спектр функций, и его экспрессия контролируется тремя транскрипционными факторами, отвечающими за ответ на проникновение антибиотика в клетку: Mar, Sox и Rob [Alekshun et al., 1997]. Экспрессия *iniBAC* негативно регулируется репрессором Lsr2 - нуклеотид-ассоциированным ДНК-связывающим белком.

Таким образом, IniBAC обеспечивает лекарственную устойчивость к изониазиду и этамбутолу, а EfpA осуществляет неспецифичный выброс веществ из клетки. Важно отметить, что экспрессия гена *lsr2* индуцируется попаданием в клетку изониазида или этамбутола [Colangeli et al., 2007]. Помимо лекарственной устойчивости, Lsr2 вовлечен в процессы адаптации к изменению кислорода в окружающей среде и персистенции [Bartek et al., 2014].

Другим примером регуляторов экспрессии клеточных транспортеров могут являться транскрипционные регуляторы семейства TetR, контролирующие различные физиологические функции бактерии: пути катаболизма, биосинтеза антибиотиков, ответ на осмотический стресс [Ramos et al., 2005]. Кроме того, они являются, в основном, репрессорами транскрипции подконтрольных им генов. Напрмер, EmrR, *E. coli* и QacR *Staphylococcus aureus* негативно регулируют транскрипцию генов МЛУ-транспортеров [Grkovic et al., 1998; Lomovskaya et al., 1995]. EthR, репрессор семейства TetR/CamE *M. tuberculosis* ассоциирован с лекарственной устойчивостью к этионамиду [Engohang-Ndong et al., 2004].

2.3.7. Организация клеточной стенки, её проницаемость.

По свойствам клеточной стенки, а именно ее низкой проницаемости для ксенобиотиков, включая антибиотики, грамм-положительные бактерии превосходят грамм-отрицательные. Данный эффект является серьезным барьером для проникновения лекарств в клетку и создает большие трудности для разработчиков антибиотиков. Например, проникновение β-лактамных антибиотиков через микобактериальную клеточную стенку в 100 раз менее эффективно, чем через клеточную стенку клеток *Escherichia coli* [Chambers et al., 1995; Kasik et al., 1968]. Несмотря на то, что микобактерии классифицируются как кислотоустойчивые грамм-положительных бактерии,

микобактериальная клеточная стенка, чрезвычайно толстая и многослойная, создает срединное пространство, схожее с периплазмой у грамм-отрицательных бактерий [Hoffmann et al., 2008]. Многослойность - характерная черта микобактериальной клеточной стенки: внутренний слой пептидогликанов покрыт слоем арабиногалактана, оба этих слоя являются гидрофильными и препятствуют проникновению гидрофобных молекул [Brennan et al., 1995]. Эти слои ковалентно связаны с миколовыми кислотами, длинноцепочечными жирными кислотами, создающими гидрофобный барьер, предотвращающий проникновение гидрофильных молекул [Liu et al., 1995].

Участие клеточной стенки в формировании природной лекарственной устойчивости было доказано благодаря проведению многочисленных экспериментов по созданию штаммов мутантных по тому или иному компоненту биосинтеза клеточной стенки. В результате было обнаружено, что штаммы *M. smegmatis,* мутантные по генам синтеза миколовых кислот (дефект по миколату), имели повышенную чувствительность к рифампицину, хлорамфениколу, эритромицину и новобиоцину [Liu et al., 1999]. В дальнейшем, работы с использованием транспозонного мутагенеза генов биосинтеза миколатов: *kasB* и *virS-mymA* определили их участие в формировании лекарственной устойчивости к рифампицину, изониазиду, пиразинамиду и ципрофлоксацину [Gao et al., 2003; Singh et al., 2005; Singh et al., 2003].

Связывание миколатов с арабиногалактановыми или трегалозными остатками в клеточной стенке катализируется семейством миколотрансфераз, также известных как "антиген 85-ого комплекса" или фибронектин-связывающие белки (FbpA, FbpB и FbpC) [Belisle et al., 1997]. Делеция гена *fbpA* приводит к снижению количества трегалоза-димиколатов в клеточной стенке и увеличивает чувствительность клетки к ряду антибиотиков, использующихся в противотуберкулезной химиотерапии [Nguyen et al., 2005].

Но, несмотря на то, что у клеток микобактерий существует мощная защита в виде толстой гидрофильно/гидрофобной клеточной стенки (пептидогликанный/микотиоловый слои), часть молекул антибиотиков проникает в клетку, а скорость роста и время, необходимое для перехода к делению клетки, позволяет накопиться веществам, используемым для лечения туберкулеза [Brennan et al., 1995; Chambers et al., 1995; Quinting et al., 1997].

2.3.8. Белки клеточного стресса

В работах с клетками *E. coli* и *Salmonella* впервые была показана корреляция между устойчивостью к антибиотикам и оксидативным стрессом [Demple, 2005]. Ответ на оба воздействия обусловливается действием одних и тех же регуляторных белков: SoxRS, MarRAB или Rob. И, хотя, механизм взаимодействия этих процессов остается неизвестным, белки-медиаторы консервативны и, предположительно, обеспечивают общий механизм ответа на клеточные стрессы различной природы [Demple, 2005]. Последние исследования, в которых была установлена связь между бактерицидной активностью антибиотиков и оксидативным стрессом, проведены в работах [Kohanski et al., 2010; Kohanski et al., 2007].

Воздействие на клетки *E. coli* бактерицидными антибиотиками индуцирует выработку клеткой гидроксил радикалов (O_2^-), которая опосредована сложным комплексом последовательных процессов, начинающихся с молекулы НАД(Н) с малатом в цикле трикарбоновых кислот [Kohanski et al., 2007]. НАД(Н) окисляется через комплекс электрон-транспортных цепей, что приводит к образованию супероксида. Супероксид восстанавливает ионы железа в железосерных кластерах и переносит двухвалентное железо для окисления в Фентоновской реакции. Гидроксил радикалы, образовавшиеся в результате Фентоновской реакции, повреждают

ДНК, белки и жиры, и приводят клетку к гибели, Рисунок 2.3 [Kohanski et al., 2007].

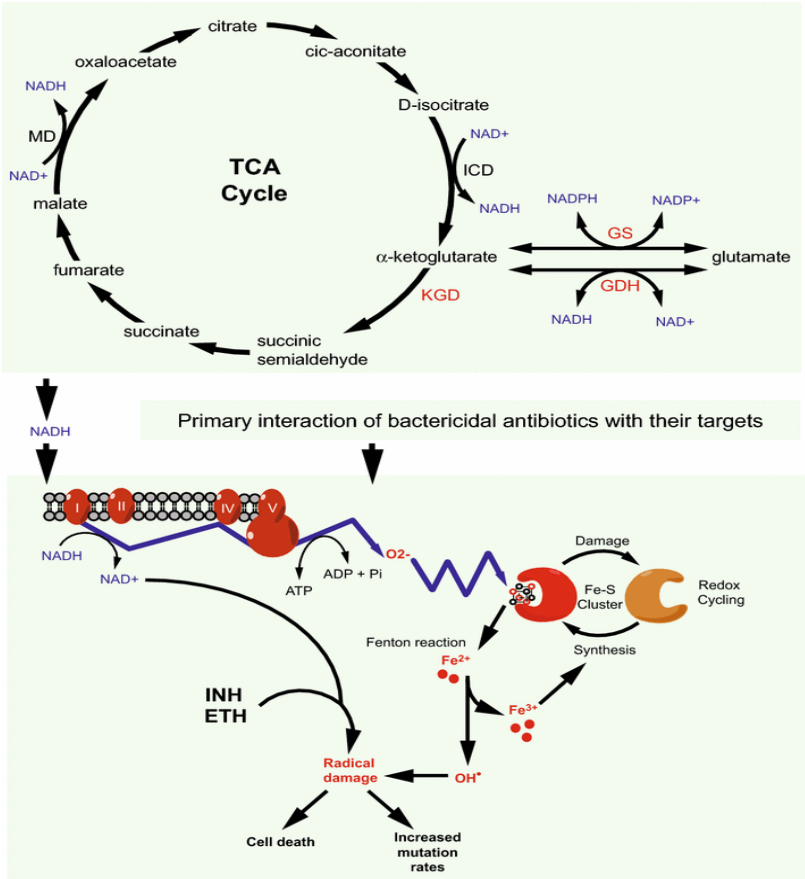


Рисунок 2.3. Схема возможной связи между ЦТК, клеточным окислительно-восстановительный балансом и бактерицидной активности антибиотиков у микобактерий туберкулеза [Kohanski et al., 2007].

Таким образом, подконтрольная индукция белков устойчивости к лекарственным средствам, совместно с белками, участвующими в устойчивости к гидроксильным радикалам, могут обеспечить лучшую защиту от бактерицидных антибиотиков.

Связь между устойчивостью к антибиотиками и ответом на оксидативный стресс была впервые показана в работах по исследованию активации про-лекарств - изониазида и этионамида с помощью белков оксидативного стресса KatG и AphC [Sherman et al., 1996; Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1992b]. Было установлено, что экспрессия стрессового сигма фактора F (SigF) индуцируется антибиотиками [Michele et al., 1999] и

микотиолом – молекулой тиола, которую микобактерии используют в качестве антиоксиданта [Buchmeier et al., 2003; Vilchèze et al., 2008].

Работы по исследованию механизмов действия транскрипционных факторов Lsr2 и WhiB7 показали, что системы ответа на кислотный стресс и лекарственная устойчивость имеют общий корень [Burian et al., 2012; Colangeli et al., 2009]. Первые работы по изучению транскрипционного фактора Lsr2 выявили три гена его регулона –*iniB, iniA, iniC*, кодирующие клеточный насос, выводящий изониазид из клетки [Colangeli et al., 2007]. В последующих работах была показана его роль в обеспечении защиты от кислотного/щелочного стресса [Bartek et al., 2014; Colangeli et al., 2009].

PknG – протеинкиназа эукариотического типа, необходимая для выживания в макрофагах хозяина, впервые определенная как фактор вирулентности микобактерий [Walburger et al., 2004]. В более поздних работах была открыта и другая функция этого белка – реализация устойчивости к антибиотикам [Wolff et al., 2009].

PknG совместно с другими киназами, у *Corynebacterium glutamicum*, фосфорилирует белок OdhI, ингибитор 2-оксоглуторат дегидрогеназы (ОГД), который гидрализует НАД$^+$-зависимый переход 2-оксоклутората (или α-кетоглутората) в сукцинил-КоА в цикле трикарбоновых кислот [Niebisch et al., 2006; O'Hare et al., 2008]. У *M. tuberculosis* в цикле трикарбоновых кислот отсутствует ОГД активность. Здесь α-кетоглуторат сначала превращается в сукциниловый полуальдегид с помощью α-кетоглуторатдекарбоксилаза (КГД) и только потом переходит в сукцинат (Рис. 2.3) [Tian et al., 2005]. Гомолог белка OdhI у *M. tuberculosis* – GarA, ингибирует КГД и НАД$^+$-зависимую глутаматдегидрогеназу (ГДГ), но усиливает активность глутаматсинтазы (ГС) [Chao et al., 2010; Nott et al., 2009]. Сходный с OdhI *C. glutamicum*, GarA микобактерий фосфорилируется множеством киназ, включая PknG [O'Hare et al., 2008] и теряет свою регуляторную функцию. Ферменты, экспрессию которых контролирует GarA, также взаимопревращают две формы

никотинамидадениндинуклеотида (НАД(Н)и НАД$^+$), как их ко-факторы (Рис 2.3). Таким образом, через регуляцию *garA*, PknG влияет на клеточный пул НАД(Н). Более того PknG, участвует в регуляции окислительно-восстановительной гомеостатической системы, которая регулирует уровень клеточного НАД(Н) через специфичные к нему (НАД(Н) гидролазы (Nudix) [Wolff et al., 2015]. Таким образом, влияние PknG на бактерицидные свойства антибиотиков, путем контроля клеточного НАД(Н) и последующего образование радикалов, приводящих к клеточной гибели, остается не изученным, но косвенно подтвержденным [Kohanski et al., 2010; Kohanski et al., 2007].

В отличие от PknG, действие MSMEG_5437 (серин-треониновая протеинкиназа, (СТПК) эукариотического типа *M. smegmatis*) не зависит от окислительно-восстановительного баланса клетки. Показано, что штамм *M. smegmatis*, мутантный по гену *MSMEG_5437*, становился чувствительным к абсолютно не связанным антибиотикам: изониазиду, тетрациклину и хлорамфениколу, что свидетельствует об участии данной протеинкиназы в клеточном ответе на изменения в окружающей среде [Bowman et al., 2014].

В работе [Bowman et al., 2014] была предложена мишень для данной СТПК – MSMEG_6129 (анти-сигма фактор). MSMEG_5437, фосфорилируя MSMEG_6129, инактивирует его активность и, таким образом, повышает Sig_x-зависимую экспрессию генов резистома.

Другим фактором контроля Sig_x-зависимой экспрессии генов природной лекарсвтнной устойчивости *M. smegmatis* - является фосфорилирование-дефосфорилирование анти-анти-сигма фактора MSMEG_6127 [Bowman et al., 2014].

На Рисунке 2.4 представлена схема регуляции Sig_x-зависимой экспрессии генов резистома *M. smegmatis*.

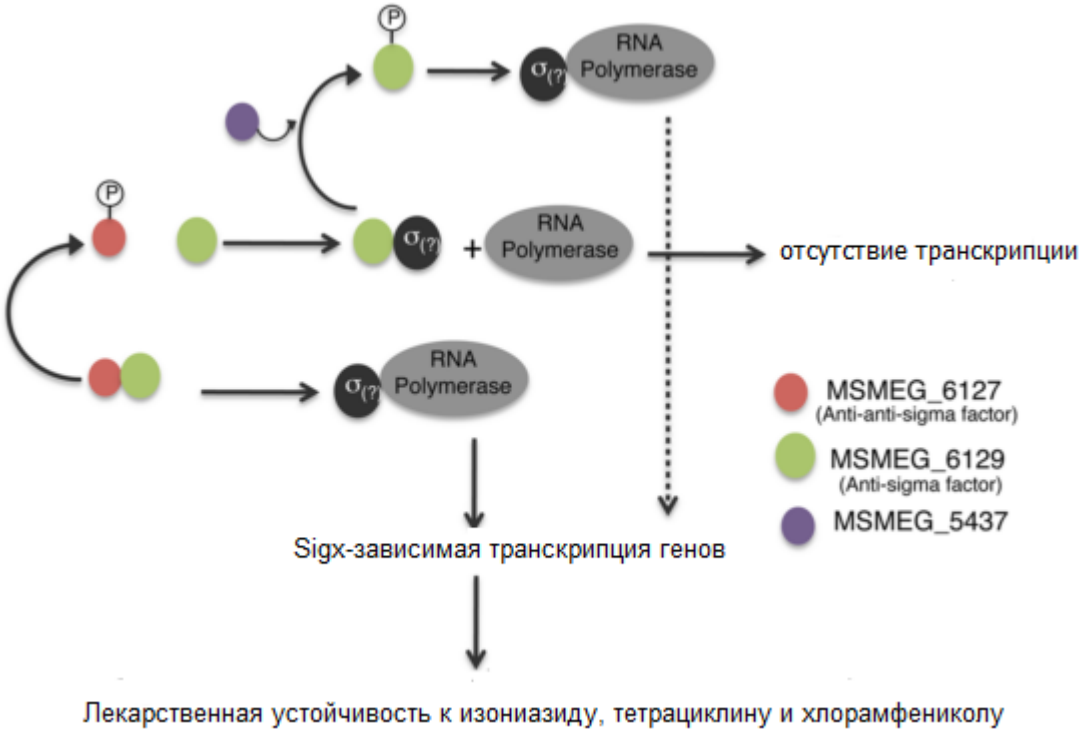


Рисунок 2.4. Схема, демонстрирующая взаимодействия регуляторов Sig_x-зависимой транскрипции генов резистома *M. smegmatis* [Bowman et al., 2014]. Анти-сигма фактор MSMEG_6129 (зеленый) регулирует сигма-фактор, необходимый для транскрипции генов устойчивости к антибиотикам. Предполагается, что MSMEG_6129 находится под негативным контролем анти-анти-сигма фактора MSMEG_6127 (красный) и MSMEG_5437 (фиолетовый).

Хорошим примером, демонстрирующим подобную регуляцию лекарственной устойчивости, является пример контроля экспрессии гена транскрипционного фактора WhiB7 – одного из ключевых регуляторов экспрессии генов природной лекарственной устойчивости у микобактерий [Burian et al., 2013].

2.3.9. Семейство транскрипционных факторов WhiB

Семейство генов *whiB(1-7)*, кодирующих транскрипционные факторы, за исключением *whiB2* [Alam et al., 2009], Таблица 2.2, обнаруживается только в

геномах Актинобактерий, в том числе *M. tuberculosis* и *Streptomyces spp* [Davis et al., 1992; Soliveri et al., 2000].

Таблица 2.2. Гены семейства *whiB*. Роль и функции у *M. tuberculosis*

Ген	Функция кодируемого белка	Роль кодируемого белка
whiB1	Репрессор транскрипции	Модуляция иммунной среды хозяина
whiB2	Шаперон	Образование септы деления клетки
whiB3	Транскрипционный фактор	Переход в дормантное состояние
whiB4	Транскрипционный фактор (предположительно)	Выживаемость в макрофагах, вирулентность
whiB5	Транскрипционный фактор	Патогенез, вирулентность
whiB6	Транскрипционный фактор	Вирулентность
whiB7	Транскрипционный фактор	Лекарственная устойчиовсть

Первый представитель семейства *whiB* был найден у *S. coelicolor*, а именно как ген, ответственный за споруляцию воздушных гиф [Davis et al., 1992]. Свое название *whiB* – white - получил после обнаружения мутантов *S. coelicolor* с белыми, непигментированными спорами [Davis et al., 1992].

Белки группы WhiB содержат четыре консервативных цистеина - характерная особенность металл-координирующих [Fe-S] ДНК-связывающих белков, и являются представителями дисульфидредуктаз [Alam et al., 2007; Garg et al., 2006; Hengst den et al., 2008].

В геноме *M. tuberculosis* обнаружено семь генов-представителей семейства *whiB*:

1) Белок WhiB1 является [Fe-S] белком, который под воздействием NO переходит из неактивной голо-формы, способной только к связыванию с ДНК, к активной нитрозилированной ДНК-связывающей форме, инициирующей транскрипцию подконтрольных WhiB1 генов. На С-конце белка WhiB1

находится ДНК-связывающий домен (GVWGG), следующий за положительно заряженными аминокислотами. [Smith et al., 2010].

Известны две мишени этого транскрипционного фактора: собственный промотор и промотор гена шаперона *groEL2*, функция которого заключается в модуляции иммунной среды хозяина. GroEL2 стимулирует и высвобождает цитокины и интерллейкин-10, а также фактор некроза опухоли α из моноцитов [Stapleton et al., 2012]. Способность реагировать на NO является важным адаптивным признаком патогенов, реакцией на активацию первоначального иммунного ответа клеток хозяина [Ralph et al., 2008].

К активной форме белка WhiB1, способной активировать транскрипционный ответ, приводит его окисление дисульфидом и восстановление тиолом [Smith et al., 2010].

2) WhiB2, в отличие от других генов семейства *whiB*, не является дисульфидредуктазой. Данный белок выполняет функцию шаперона, независимого от АТФ, собственного окисленного или восстановленного состояния и от ко-шаперонов [Konar et al., 2012]. Было показано, что консервативные цистеиновые остатки WhiB2, свойственные WhiB-семейству, так же способны связываться с [Fe-S] кластером, но функционально незначимы.

В работах, посвященных изучению фукции гена *whmD* – гомолога *whiB2* у *M. smegmatis*, была определена роль WhmD в образовании септы при клеточном делении (при сверхэкспрессии гена линейный размер клеток *M. smegmatis* уменьшается, что доказывает усиленное формирование септ) [Raghunand et al., 2006]. Более того, качество образующихся клеточных стенок уменьшалось и, как следствие, клетки лучше поддавались лизису [Gomez et al., 2000]. Остается невыясненным, как шаперонная функция белка используется в клеточном делении.

Предполагается, что WhiB2 вовлечен в сборку и стабилизацию FtsZ кольца [Huang et al., 2013] вокруг клеточной септы при делении. Эти данные

подтверждает то, что белок WhiD *S. coelicolor*, гомолог WhiB2, участвует в такого рода процессах [Davis et al., 1992].

Кроме того, уровень экспрессии *whiB2* повышается при ответе на клеточные стрессы, вызванные действием антибиотиков и SDS, но снижается при увеличении температуры до 42°C [Geiman et al., 2006].

Таким образом, ключевой ролью WhiB2 является регуляция клеточного деления при попадании в организм-хозяина, при первичном иммунном ответе [Konar et al., 2012].

3) Транскрипционный фактор WhiB3 является «redox» зависимым транскрипционным фактором и активируется при попадании бактерий *M. tuberculosis* в макрофаги. Исследования *in vitro* показали, что экспрессия *whiB3* повышается в ответ на сигналы дормантности, например, при снижении концентрации активных форм O_2 и NO.

WhiB3 участвует в осуществлении антибиотикотолерантности к кислотному стрессу [Banaiee et al., 2006; Mehta et al., 2016]. Однако, исследования фенотипа, (штаммов, нокаутированных по гену *whiB3*) не выявили определенную роль этого транскрипционного фактора в регуляции контроля выживаемости клеток в ответ на гипоксию или действие NO [Singh et al., 2007]. Показано, что WhiB3 контролирует экспрессию множества генов ответа на кислотный стресс. Это гены:

1. Синтеза сложных поликетидных липидов – *pks2*, полиацилтригалозы/диацилтригалозы (*pks3-pks4*);
2. Метаболизма цистеина (*cysW*, *cysN*, *cysA1*, и *metZ*);
3. Биосинтеза аминокислот (*metH*, *metK*, *leuB* и *sahH*);
4. ESX-1 системы секреции (*rv3614c-rv3616c*);
5. MSH оксидативной защиты (*mca* и *mtr*);
6. Транспорта нитритов (*narK1*);
7. PE-PPE гены (*PE-24*, *PE-8*, *PE-32*, *PPE-65*, и *PPE-31*);
8. Рибосомальных белков (*rpmH*, *rplU*, и *rplY*);

9. Транскрипционных регуляторов (*whiB7*, *rv0827c*, и *rv3183*).

Таким образом, транскрипционный фактор WhiB3 является регулятором выживаемости, изменения липидного состава клеточной стенки, секреции и окислительно-восстановительного баланса [Mehta et al., 2016].

4) Белок WhiB4, предположительно, участвует в процессе патогенеза *M. tuberculosis*. Как и другие представители семейства WhiB, WhiB4 содержит чувствительный к кислотности [Fe-S] кластер, который деградирует в присутствии кислорода, также данный белок чувствителен к NO [Jakimowiczetal., 2005; Singhetal., 2007; Smithetal., 2010].

Экспрессия *whiB4* индуцируется при длительном пребывании клетки в анаэробных условиях [Rustad et al., 2008] и при недостатке питательных веществ [Betts et al., 2002]. К тому же она напрямую зависит от наличия окислителей в клетке *M. tuberculosis*, таких как: диамид и кумилгидропероксид, SDS, этиловый спирт, изониазид [Geiman et al., 2006].

На сегодняшний день не известны гены, экспрессия которых подконтрольна WhiB4, но фенотипические проявления, а также структурное сходство с транскрипционном фактором Lsr2 (см. Раздел 2.3.6) позволяют предположить участие этого фактора в выживаемости и вирулентности [Chawla et al., 2012].

5) Белок WhiB5 обнаружен у всех актиномицетов за исключением *M. leprae* и *M. smegmatis*. Отличительной структурной особенностью этого транскрипционного фактора является измененный мотив, содержащий консервативные цистеины: в «C-X_{19-36}-C-X-X-C-X_{5-7}-C» происходит вставка аминокислоты между вторым и третьим цистеином – «C-X-X-X-C» [Alam et al., 2009]. Функциональная нагрузка данного белка недостаточно изучена. Известно, что штамм, мутантный по гену *whiB5* не приводил к ослаблению или усилению роста культуры *M. tuberculosis* в организме хозяина (мышей), но отмечалось двукратное увеличение размера гранулем и усиление воспалительного процесса в легких, в отличие от действия штамма

M. tuberculosis дикого типа. Также, установлена роль WhiB5 в осуществлении реактивации хронической инфекции [Casonato et al., 2012].

В отличие от других представителей семейства WhiB *M. tuberculosis*, WhiB5 регулирует экспрессию не только определенных генов собственного регулона, но и экспрессию альтернативного сигма-фактора SigM [Österberg et al., 2011], который, в свою очередь, регулирует экспрессию 12 генов, включая гены системы секреции VII типа (ESX-4 и ESX-2). Гены прямого подчинения WhiB5 – *rv2078*, *rv1951c* и *rv3891c* (*esxD*) до сих пор функционально не изучены [Casonato et al., 2012].

6) Экспрессия гена *whiB6*, как и большинства членов семейства *whiB*, зависит от окислительно-восстановительного баланса - NO и повышается при инфицировании макрофагов хозяина [Larsson et al., 2012; Saini et al., 2012]. Также было установлено, что экспрессия гена *whiB6* активируется при продолжительной гипоксии [Homolka et al., 2010].

В работе [Kassa et al., 2012], с использованием метода ELISA [Li et al., 2014], была определена роль WhiB6 как реактивационно-ассоциированного антигена к интерферону γ (IFN-γ) при активной форме туберкулеза [Kassa et al., 2012]. Также было показано участие данного белка в работе системы ESX-1 (система секреции, ответственная за вирулентность) на уровне WhiB6 производных [Champion et al., 2014; Solans et al., 2014].

2.3.10. Транскрипционный фактор WhiB7

Впервые ген *whiB7* и его функция были определены у *S. lividans*. Спонтанный мутант *S. lividans*, отличающийся повышенным уровнем чувствительности к антибиотикам (хлорамфениколу, тетрациклину, макролидам, карбопенемам, линкозамидам и рифампицину), характеризовался неизмененным уровнем устойчивости к различным клеточным стрессам

(Рисунок 2.5) [Morris et al., 2005]. Обнаруженный ген был квалифицирован как представитель семейства транскрипционных факторов *whiB* [Davis et al., 1992].

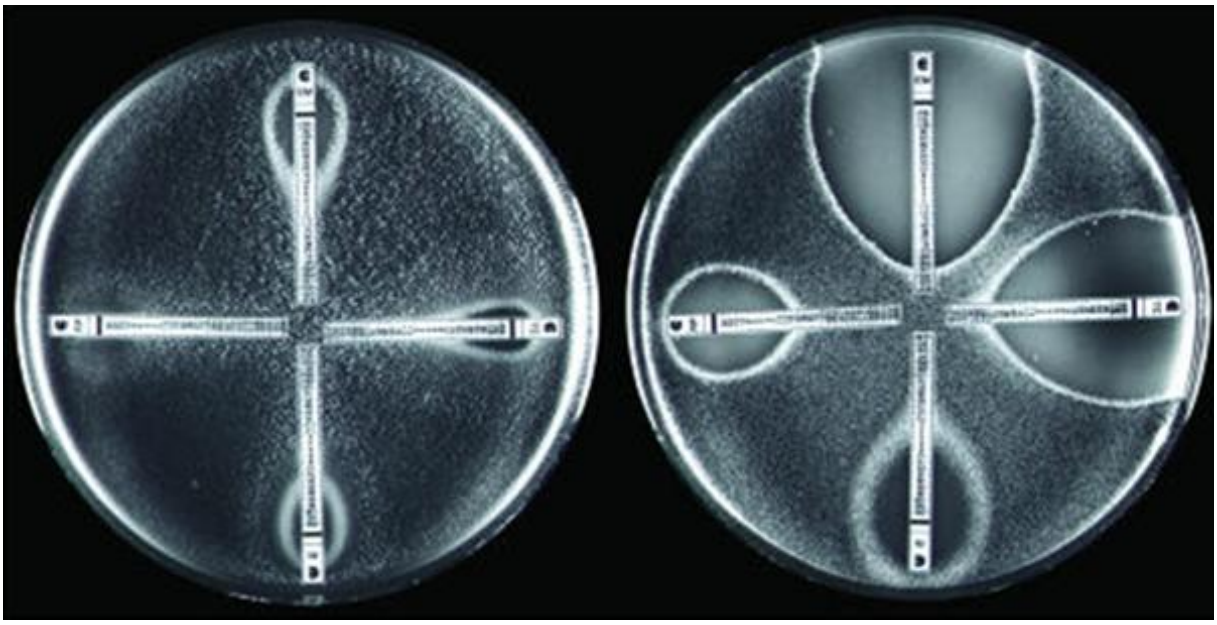


Рисунок 2.5. Увеличение уровня лекарственной чувствительности у *S. lividans*, мутантного по гену *whiB7*. Слева – чашка Петри с культурой клеток *S. lividans* дикого типа, справа - *S. lividans*, мутантный по гену *whiB7*. Использованы МИК-полоски (Etest, bioMérieux) с: эритромицином (вверх), тетрациклином (вправо), рифампицином (вниз), квинупристин/дальфопристином (влево), показывающие зону ингибирования роста и шкалу концентрации антибиотика [Morris et al., 2005].

Как и все представители семейства WhiB, WhiB7 имеет следующие структурные особенности (Рисунок 2.6): вариабельный N-конец, четыре консервативных цистеиновых остатка [Soliveri et al., 2000], которые являются лигандами для связывания с железом ([Fe-S] кластер) [Jakimowicz et al., 2005], триптофан/глицин богатый мотив, образующий β-тяж и положительно заряженные аминокислоты в С-конце [Soliveri et al., 2000], соответствующие последовательности (RKRPRGRPRK), связывающейся с A/T-богатыми последовательностями ДНК - A/T-крючок [Aravind et al., 1998].

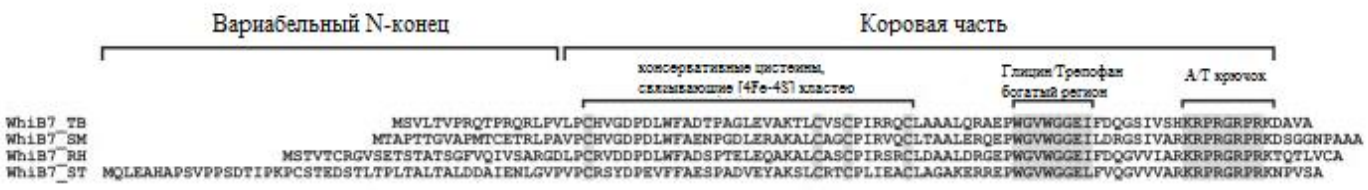


Рисунок 2.6. Выравнивание последовательностей WhiB7 разных представителей актиномицетов. *TB-M. tuberculosis*; *SM- M. smegmatis*; *RH- R. jostii*; *и ST- S. coelicolor* [Ramón-García et al., 2013].

Цистеиновый мотив WhiB7 соответствует консервативной области «C-X_{19-36}-C-X-X-C-X_{5-7}-C» других представителей семейства WhiB и, предположительно, выполняет роль координатора [Fe-S] кластера [Ramón-García et al., 2013]. Однако участие четырех цистеинов в металл-координации (связывание с [Fe-S] кластером) у WhiB7 до сих пор не доказано.

Эксперименты по проведению сайт-направленного мутагенеза показали функциональную необходимость цистеиновых остатков у WhiB3 [Singh et al., 2009], WhiB4 [Alam et al., 2007], WhiD [Jakimowicz et al., 2005] и у WhiB2 [Raghunand et al., 2006b]. Штаммы, мутантные по C-X-X-X мотиву белков WhiB, не способны к координации железосерного кластера белка [Alam et al., 2007]

Как было описано выше, почти все гены семейства *whiB* кодируют транскрипционные активаторы или репрессоры (*whiB1)* [Smith et al., 2010; Stapleton et al., 2012]. WhiB7, как и другие белки семейства WhiB, является окислительно-восстановительно зависимым транскрипционным активатором генов, объединяемых в регулон [Burian et al., 2013]. Консервативная промоторная часть *whiB7*, у всех Актинобактерий, включает в себя: AT-богатый мотив, находящийся сразу перед -35 гексамером (Рисунок 2.7) [Burian et al., 2012; Burian et al., 2013].

M. tuberculosis	*Rv3197a*	TCA	GAAAAT	CGG	TTGTGG	(18)	TAACCT	CCAGGTC	(352)	GTG
M. smegmatis	*MSMEG_1953*	GTA	GAAAAT	AGG	TTGTGC	(18)	TAGCCT	CAGAAAG	(444)	ATG
Streptomyces coelicolor	*SCO5190*	CGA	GAAAAT	AGT	TTGCGC	(18)	TAGGTT	CTTGGTC	(613)	GTG
Actinosynnema mirum	*Amir_0929*	TTG	GAAAAT	CGG	TTGCAC	(18)	TAACCT	GCTCAGG	(482)	ATG
Amycolatopsis mediterranei	*AMED_1235*	CCG	TTAATT	GAG	TTGCCC	(18)	TAACCT	GCCAGTA	(494)	ATG
Geodermatophilus obscurus	*Gobs_4230*	CGG	TTAATT	GCG	TTGACC	(18)	TACTGT	CCTGATC	(535)	GTG
Gordonia bronchialis	*Gbro_3493*	GTC	AAAAAT	AGG	TTGTGC	(18)	TAGTCT	GGTCAGG	(424)	ATG
Salinispora tropica	*Strop_3737*	CCC	TAAATT	CGT	TTGCCC	(18)	TAGCCT	CGGGACA	(462)	ATG
Micromonospora aurantiaca	*Micau_5287*	GCC	GTAAAT	CGT	TTGCCC	(18)	TAGCCT	CATGACA	(470)	ATG
Kytococcus sedentarius	*Ksed_19130*	GGG	AAAAAG	GGA	TTGCCG	(18)	TAGTGT	GGGCTCA	(361)	ATG
Tsukamurella paurometabola	*Tpau_3044*	GTC	AAAAAT	AAC	TTGTGC	(17)	TACTGT	GGATCTC	(492)	GTG
Saccharomonospora viridis	*Svir_07550*	CTG	AAAAAT	AAG	TTGCCG	(17)	TAACCT	GCAAGCA	(458)	ATG
Nocardia farcinica	*nfa45320*	GTA	GAAAAT	AGG	TTGTCG	(17)	TATGGT	GGTTTCA	(517)	ATG
Rhodococcus sp. RHA1	*RHA1_ro06383*	GTC	AAAAAT	AGG	TTGTGC	(17)	TACTGT	GGTTTCA	(382)	GTG
			Сайт связывания WhiB7		-35		-10			

Рисунок 2.7. Выравнивание нуклеотидных последовательностей промоторных областей генов *whiB7* у различных представителей класса актинобактерий. [Burian et al., 2012]

Также, A/T-богатый мотив был обнаружен и в промоторных областях генов регулона WhiB7 (Рисунок 2.8). Таким образом, транскрипционный фактор WhiB7 регулирует транскрипцию не только генов своего регулона, но и собственного гена [Burian et al., 2012].

Rv2416c-eis	CGT	AATATT	CAC	GTGCAC	(17)	CACAGT	CGGATTCTGTG		
Rv1258c-tap	GCA	GAAATT	CGG	TGGCCC	(17)	TAGATT	CAGCCGC	(7)	ATG
Rv1988-ermMT	CGA	GAAATT	GGA	TTGATC	(18)	TACGGT	CGGGCGC	(28)	GTG
MSMEG_1646-erm(38)	TGA	AAAATT	CGC	TTGAGC	(18)	TACCCT	GGCCGTC	(122)	GTG
		Сайт связывания WhiB7		-35		-10			

Рисунок 2.8. Предполагаемые сайты связывания WhiB7 рядом с промоторными последовательностями некоторых генов регулона WhiB7 *M. tuberculosis* H37Rv, а также *erm*(*38*) – ортолога гена *erm M. tuberculosis* у *M. smegmatis*.

Промоторная область *whiB7* сильно напоминает консервативную последовательность сайта связывания вегетативного σ-фактора A (SigA) [Burian et al., 2013], а близость A/T-связывающего крючка с -35 гексамерной последовательностью, демонстрирует, что WhiB7 может участвовать в стабилизации SigA-ДНК комплекса и необходим для саморегуляции и

инициации транскрипции генов собственного регулона [Burian et al., 2012; Dove et al., 2003; Hijum van et al., 2009].

Регулон WhiB7 – гены, экспрессия которых индуцируется транскрипционным фактором WhiB7. Он состоит из 12 генов, из которых 4 полностью охарактеризованы как определяющие лекарственную устойчивость. К ним относятся: гены клеточных транспортеров – *tap* (*rv1258c*) и *rv1473*, ген *erm*(*37*) (*rv1988*) (см. Раздел 2.3.1) и *eis* (*rv2416c*) (см. Раздел 2.3.3) [Morris et al., 2005]. Эти четыре гена, а возможно и другие неизученные гены регулона, обеспечивают лекарственную устойчивость к широкому спектру антибиотиков, Рисунок 2.9.

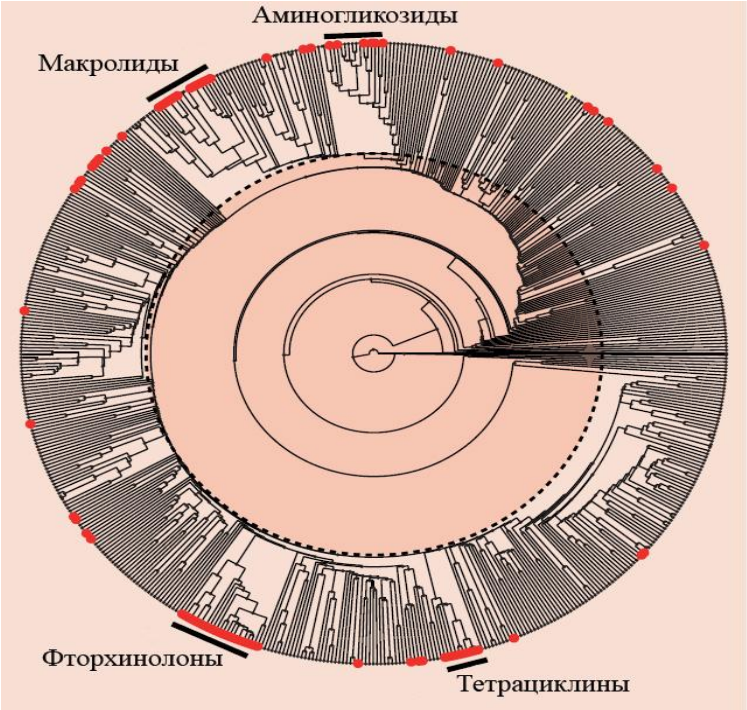


Рисунок 2.9. Транскрипция гена *whiB7* индуцируется антибиотиками, не имеющими различные биомишени, и отличающимися по структуре. Вещества, ингибирующие экспрессию *whiB7* сгруппированы (выделены красным цветом) на основе их химической структуры. Алгоритм кластеризации Танимото. (Burian J *et. al*., 2012).

Tap имеет целый ряд функций, в том числе обеспечение лекарственной устойчивости к различным антибиотикам. Доказано его участие в обеспечении низкого уровня лекарственной устойчивости к стрептомицину, изониазиду и рифампицину [Ramón-García et al., 2012]. Также Tap выполняет важные физиологические функции – организация и поддержание структуры клеточной стенки. Помимо выполнения физиологических функций, Tap играет ключевую роль в способности *M. tuberculosis* существовать в клетках макрофагов и развитии антибиотикотолерантности при инфицировании. [Reeves et al., 2013].

Rv1473 является геном, кодирующим макролидный ABC-транспортер. На сегодняшний день определена его роль в формировании лекарственной устойчивости к антибиотикам макролидного ряда [Morris et al., 2005]. Также предполагается, что ABC транспортер - это комплекс двух белков, одним из которых является *Rv1473* [Braibant et al., 2000].

Erm является рибосомальной РНК-метилтрансферазой, обеспечивающей устойчивость к антибиотикам макролидного ряда [Buriánková et al., 2004]. (см. Раздел 2.3.1).

Eis был первым белком регулона, чья функция была определена, как медиатор выживании при попадании в макрофаги хозяина [Wei et al., 2000]. Также Eis обеспечивает устойчивость к аминогликозидным антибиотикам [Chen et al., 2011]. (см. Раздел 2.3.3).

Функциональная нагрузка WhiB7 сохраняется у всех *Streptomyces* и *Mycobacterium*. Транскрипция *whiB7* индуцируется воздействием на клетку антибиотиков, недостатком железа, различными стрессовыми состояниями и вступлением в стационарную фазу [Geiman et al., 2006].

Важно отметить, что большое количество белка WhiB7 обнаруживается в клинических изолятах *M. tuberculosis*, выделенных сразу после заражения *in vitro* покоящихся и активных макрофагов.

Таким образом, WhiB7 система является представительной системой природной лекарственной устойчивости. Антибиотик, или другой антибактериальный агент, попадая в клетку, вызывает множественный каскад реакций – ответ на стресс. WhiB7 как «redox» чувствительный транскрипционный фактор, активируясь при изменении кислотности, запускает экспрессию генов своего регулона, а также собственного гена, тем самым повышает уровень лекарственной устойчивости бактерии к различным классам антибиотиков [Nguyen et al., 2006]. Таким образом, гипотетической схемой WhiB-зависимой лекарственной устойчивости может стать представленная ниже, Рисунок 2.10.

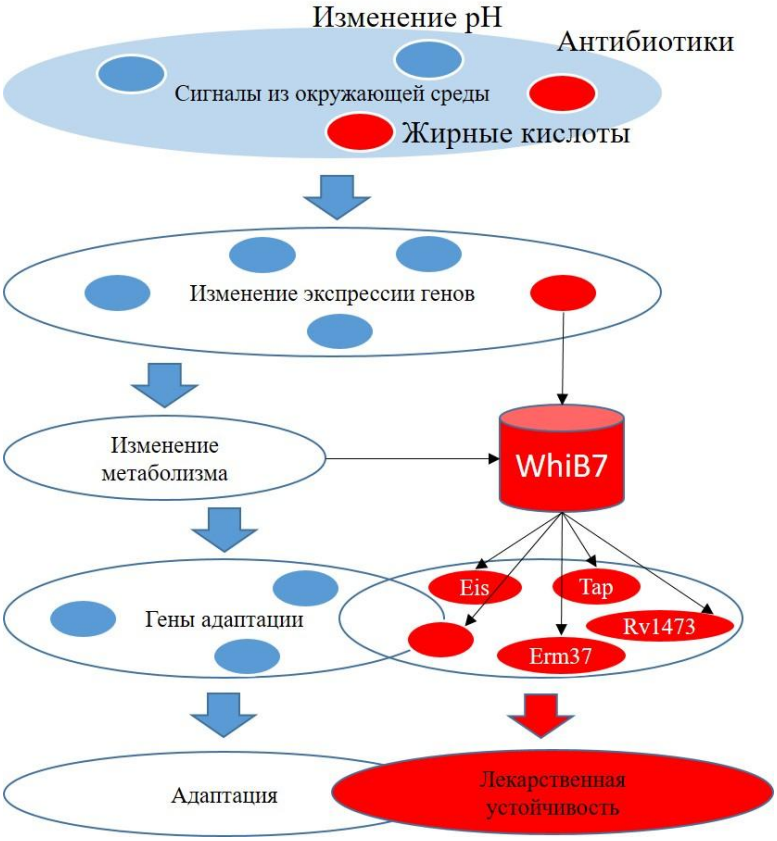


Рисунок 2.10. Индуцированная антибиотиками экспрессия гена *whiB7*. Предполагаемая схема функционирования системы транскрипционного фактора. WhiB7 [Morris et al., 2005].

Как было описано выше, гены регулона WhiB7 участвуют в обеспечении лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* в ответ на действие. В том числе

антибиотиков. В данном случае изучение развития перекрестной лекарственной устойчивости, является приоритетной и важнейшей задачей. Знание такой системы позволит определить реальный спектр лекарственной устойчивости изолятов *M. tuberculosis* из организма человека, а также позволит проводить более качественно терапию туберкулеза [Reeves et al., 2013].

2.4. Вещества, снижающие лекарственную устойчивость (адъюванты антибиотиков)

Для повышения эффективности антибиотиков используются вещества, не обладающие антибактериальной активностью, называемые адъювантами антибиотиков. Такие вещества характеризуются увеличением эффективности используемых антибиотиков через минимизирование или снятие лекарственной устойчивости [Bernal et al., 2013; Gill et al., 2015; Kalan et al., 2011]. Адъювант применяется совместно с антибиотиком и является частью комбинированного препарата. Концепция использования адъювантов появилась после успешных клинических исследований применения комбинаций антибиотиков в терапии (антибиотик А + антибиотик Б) [Worthington et al., 2013]. Синергический эффект, вызываемый такими комбинациями, используется уже на протяжении десятилетий [Eliopoulos et al., 1988]; Наиболее распространенными и общеизвестными: гентамицин + ампициллин для лечения энтерококковой инфекции или многокомпонентная схема противотуберкулезной химиотерапии (См. Раздел 1.3.). Однако проблемы, связанные с подбором комбинации антибиотиков, оценки эффективности, вынуждают искать замену синергическому эффекту. Такими веществами стали адъюванты. Данные вещества сами по себе не обладают антибактериальным действием, но при определенных условиях, а именно в комбинации с антибиотиком, усиливают действие антимикробного агента. Адъюванты антибиотиков, исходя из их мишеней, можно разделить на два

класса: I класс адъювантов имеет аналогичные мишени с антибиотиками (Аугментин [Neu et al., 1978]; II класс адъювантов действует на иные мишени, не являющиеся мишенями антибиотиков, и снижают возможности бактерии к ответу на действие лекарства (LL-37 [Hancock et al., 2012], GABA-SiO_2 [Grumezescu et al., 2014]) [Wright, 2016].

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

E. coli DH5a: F^-, *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *deoR*, *nupG*, *purB20*, φ80d*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*) U169, hsdR17 ($r_K^- m_K^+$), λ^- (Promega);

M. smegmatis mc^2 *155*: спонтанный мутант штамма дикого типа *M. smegmatis ATCC 607* с повышенной частотой трансформации [Snapper et al., 1990].

3.2. Плазмидные векторы, использованные в работе

Для проведения клонирования и экспрессии генов были использованы следующие генетические векторы:

1. pMIND Km- [Беккер О.Б. et al., 2012] (Рисунок 3.1), для экспрессии в клетках *M. smegmatis*

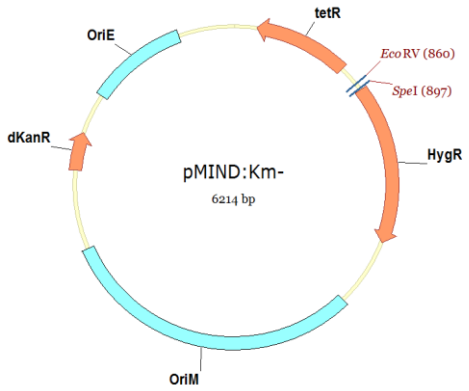


Рисунок 3.1. Карта челночного экспрессионного вектора pMIND. На рисунке показано: *hgR* – ген гигромицин-B-фосфотрансферазы *из Streptomyces hygroscopycus;* OriE – точка начала репликации в *E.coli* из плазмиды pBR322; OriM – точка начала репликации микобактериальной pAL5000; *kanR* – ген аминогликозид 3’-фосфотрансферазы из *Rhodopseudomonas palustris*; *tetR* – тетрациклиновый репрессор из плазмиды

pAG1 *Corynebacterium glutamicum*; уникальные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

3.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе

В работе использовались олигонуклеотиды, синтезированные компанией «Синтол» (http://www.syntol.ru/) и «Евроген» (http://evrogen.ru/). Все олигонуклеотиды, использование при проведении работ представлены в Таблице 1, Приложения Б. Олигонуклеотиды, использованные для проведения сайт-направленного мутагенеза, а также для клонирования были сконструированы с использованием программы «Oligo 7» (Molecular Biology Insights, Inc.). Праймеры для проведения секвенирования образцов ДНК *M. tuberculosis* и клонированных фрагментов были созданы с использованием программы Primer BLAST [Ye et al., 2012].

3.3.1. 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.

В работе использовали последовательность ДНК гена *whiB7* с кодонами, адаптированными для экспрессии в клетках *E. coli*. Синтез гена был заказан в компании «Евроген» (http://evrogen.ru/).

Качественная и количественная оценка ДНК материала проводили с использованием прибора NanoDrop 1000, соотношение A260/280 >1,8 – 2,0.

3.3.2. Выделение РНК

РНК выделяли из бактериальной культуры *M. smegmatis*, культивируемой с низкой концентрацией антибиотиков, а также культуры без антибиотика.

В предварительно охлажденные, осажденные центрифугированием клетки добавляли Trizol (Invitrogen) и гомогенизировали на максимальной скорости на приборе Speedmill plus (Analytik Jena) 4 раза по 30’’ с промежуточным охлаждением во льду в пробирках, содержащих стеклянные шарики (диаметр 0,1 мм). После центрифугирования (1’ 12,000*g), отбирали супернатант и добавляли к нему хлороформ/изоамиловый спирт (24/1) и перемешивали. Далее центрифугировали (15’ 12,000*g), отбирали верхнюю фазу и к ней добавляли водонасыщенный фенол (pH = 4,5-5) и перемешивали. Повторно центрифугировали (15’ 12,000*g) до исчезновения интерфазы, отбирали верхнюю фазу и к ней добавляли хлороформ, осаждали, отбирали водную фазу и к ней добавляли 9/10 частей изопропанола и 1/10 часть High Salt Solution (0,8 M цитрат натрия; 1,2 M NaCl). Инкубировали во льду и осаждали центрифугированием 30’ 12,000*g. Далее отмывали 75% этанолом и растворяли в воде.

Анализ качества выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле, количественный с использованием флуориметра Qbit (Invitrogen).

Для удаления контаминирующей геномной ДНК использовали ДНКазу I (TURBO DNA-free™ Kit, Ambion) согласно рекомендациям производителя.

3.3.3. Проведение реакции обратной транскрипции

Реакцию синтеза кДНК по матрице выделенной РНК проводили с использованием коммерческого набора «iScript Select cDNA Synthesis kit» (Bio-Rad) согласно инструкциям производителя.

3.4. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами

3.4.1. Амплификация ДНК

Реакцию амплификации ДНК проводили с использованием коммерческих наборов «BioTaq ДНК полимераза» компании «Диалат Лтд» и High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) и FastStart High Fidelity PCR System dNTPPack (Roche, Швейцария) на приборах C1000 или T100 (Bio-Rad, США), SpeedCycler2 (Analytic Jena) и Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология).

Конечная, реакционная смесь содержала: 1× буфер для ПЦР, $MgCl_2$ 1,5mM, ∑dNTPs 0,5 mM каждого, смесь ферментов из расчета 5 е.а. на 100 мкл смеси, праймеры по 20 нг на 100 мкл смеси, а также матричную ДНК в количестве от 1 до 100 нг в 100 мкл смеси.

Подбор условий реакции амплификации, а также соотношения $MgCL_2$ в реакционной смеси подбирали с использованием температурного и концентрационного ($MgCl_2$) градиента на приборе Bio-Rad C1000 или T100 (Bio-Rad, США).

Стандартная программа реакции амплификации:

95°C – 5’

20-35 циклов:
- 95°C – 30’’
- Tm°C – 30’’
- 72°C – 1’ (на 1000 п.о.)

72°C – 10’

3.4.2. Амплификация ДНК в режиме реального времени

Реакцию амплификации ДНК в режиме реального времени проводили с использованием коммерческих наборов «iTaq Universal SYBR Green Supermix» на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

Конечная, реакционная смесь содержала: 1× буфер для ПЦР, содержащий $MgCl_2$, и dNTPs, hot-start iTaq полимеразу, SYBR Geen I, а также минорные компоненты, праймеры по 40 пМоль на 100 мкл смеси каждого, а также кДНК в количестве 10 нг на 100 мкл смеси.

Подбор оптимальных условий реакции амплификации, подбирали с использованием температурного градиента на приборе Bio-Rad C1000 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени.

Программа реакции амплификации:

95°C – 30’’

40 циклов { 95°C – 10’’
65,2°C – 30’’

Градиент температуры плавления 65°C – 95°C - 5’’

Амплификацию проводили с использованием праймеров, представленных в Таблице 1 Приложение Б.

Расчет уровня экспрессии, температур плавления, а также 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). Анализ относительного уровня экспрессии проведен в трех независимых повторах.

3.4.3. Выделение и очистка плазмидной ДНК

Бактериальную культуру *E. coli*, несущую целевую плазмиду, засевали в 10-50 мл среды LB с добавлением селективного антибиотика и инкубировали при перемешивании (250 об/мин) и 37ºC в течении ночи (~16 часов). Далее клеточную суспензию отделяли от культуральной среды при помощи центрифугирования при 4000-7800 об/мин 20-10 минут. Непосредственно

выделение и очистку плазмидной ДНК проводили наборами GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) следуя инструкциям производителей из культур *E. coli* объемом 10 мл. Для достижения высокого выхода плазмидной ДНК использовали набор QIAGEN Plasmid Midi Kit Plus (QIAGEN) и объем культуры 50 мл.

3.4.4. Очистка фрагментов ДНК

Очистка ДНК из реакционной смеси (амплификация, рестрикция, лигирование) проводили с использованием коммерческих наборов GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

3.4.5. Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение фрагмента ДНК из 1-2% агарозного геля проводили с помощью наборов GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

3.4.6. Реакция рестрикции

Для проведения реакции рестрикции ампликонов и плазмид использовали эндонуклеазы рестрикции фирмы Thermo Scientific, в том числе с использованием ферментов серии Fast Digest с укороченным временем реакции рестрикции ДНК. Реакцию рестрикции проводили при 37ºС в течение 60 минут или 20 минут для ферментов серии FastDigest, после чего проводили термоинактивацию, если она была предусмотрена протоколом фирмы производителя. Фрагменты ДНК после реакции рестрикции очищали с использованием наборов, описанных в Разделе 3.5.3.. Для плазмидных

векторов использовался метод выделения из 2% агарозного геля с использованием коммерческого набора, описанного в Разделе 3.5.4.

3.4.7. Реакция лигирования

Лигирование фрагментов ДНК после проведения реакций рестрикции проводили с использованием Т4 лигазы фирмы “Thermo Fisher”. Молярное соотношение фрагментов при лигировании составляло 1:5 (pMIND и *whiB7*(*whiB7*ΔG_{191}), *tap*(*tap*(insC_{581}) и 3:1 при лигировании гена *Rv1473* и его мутантного варианта.

Реакционная смесь имела следующий состав: плазмидный вектор, клонируемый фрагмент, Т4 ДНК-лигаза (30 е.а. на 30 мкл смеси), 1× лигазный буфер. Реакцию проводили при температуре 22ºС в течение 1 часа, после чего проводили термоинактивацию фермента при 65ºС в течение 10 минут.

3.4.8. Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения количественного и качественного анализа фрагментов ДНК, а также для выделения рестрицированных плазмид проводился электрофорез в 1-2% агарозном геле.

Сначала проводили плавление агарозы в электродном буфере 1X TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6), застывший гель далее использовали для разделения фрагментов ДНК. Пробы наносили с добавлением специального 6х-красителя (6X Loading Dye (ThermoFischer Scientific, США)). В качестве маркера длины и концентраций использовали маркеры: ДНК фага λ рестрицированного по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Eco*RI и *Hind*III (ThermoFischer Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler (ThermoFischer Scientific, США). Электрофорез проводили при напряженности 5-7,5 В/см.

3.4.9. Количественная оценка ДНК, РНК

Ориентировочную количественную оценку ДНК проводили на электрофореграмме. Для более точного определения использовался флуоресцентный метод с использованием прибора Qubit (ThermoFischer Scientific, США) по протоколу производителя с использованием наборов 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).

3.4.10. Сайт-направленный мутагенез гена *whiB7*

Процедура сайт-направленного мутагенеза была проведена по методу точковых мутаций Нельсона [Nelson et al., 1989]. Праймеры для проведения мутагенеза указаны в Таблице 1, Приложения Б. Для получения инсерции использовались праймеры *whiB7*Mt_mixdir и *whiB7*Mt_mix-, внешними праймерами служили: whiB7Mt_dir и whiB7Mt_mixrev. Внешний праймер whiB7Mt_dir соответствовал 5’ концу гена *whiB7* с адаптированными кодонами, whiB7Mt_mixrev – 3’ конце *whiB7* из *M. tuberculosis*. Полученные в результате проведенного мутагенеза фрагменты секвенировали для подтверждения соответствующих нуклеотидных замен, после чего клонировали в составе необходимого экспрессионного вектора. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и секвенировали полученные мутантные генетические конструкции.

3.4.11. Пиросеквенирование ДНК *M. tuberculosis*

Для проведения секвенирования геномов *M. tuberculosis* был использован секвенатор 454 GS Junior (Roche, Швейцария). Пробоподготовка для секвенирования была проведена в соответствии с рекомендациями

производителя и с использованием соответствующих реагентов. Библиотеки фрагментов ДНК (ShotGun) готовили по стандартному протоколу Rapid Library или Rapid Library+; секвенирование фрагментных библиотек на приборе Roche 454 GS Junior проводили с использованием версии реактивов Titanium (Roche); средняя длина единичных прочтений высокопроизводительного секвенирования составляла около 450 нуклеотидов для библиотек приготовленных с использованием версии реактивов Rapid Library и 1200 для Rapid Library+. Сборка отдельных прочтений фрагментов ДНК в контиги проводили 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.

3.4.12. Генотипирование клинических изолятов *M. tuberculosis*

Генотипирование клинических изолятов проводили с использованием MIRU-VNTR по 24 локусам, согласно стандартному протоколу, [Supply et al., 2006] генотипирование проводилось с использованием базы [Weniger et al., 2010].

Генотипирование с использованием метода сполиготипирования производили по протоколу, описанному в работе [Kamerbeek et al., 1997], определение сполиготипа - с использованием базы данных SpolDB4 [Brudey et al., 2006].

3.5. Работа с бактериальными культурами

Культивирование клеток *E. coli* проводили в жидкой среде LB (Lysogeny broth) - 10 г/л бакто-триптона, 10 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта при 37°C и перемешивании 250 об/мин и на твердой среде LB с добавлением 2.0% агара.

Культивирование клеток *M. smegmatis* проводили в жидкой среде Lemco-TW (5 г/л бакто-пептона (Oxoid, Соединенное Королевство), 5 г/л Lemco

Powder (Oxoid, Соединенное Королевство), 5 г/л хлористого натрия NaCl и 0,05% Tween-80 (ICN Biomedicals, США)) и на твердой среде Триптон-соевый агар M290 (Himedia, Индия).

3.5.1. Подбор концентраций антибиотиков

Поиск концентраций антибиотиков, для индукции экспрессии генов резистома был проведен с использованием культуры *M. smegmatis* mc^2 155 в жидкой среде Lemco-TW. Для анализа использовали только ту концентрацию антибиотика (стрептомицина, канамицина, офлоксацина, тетрациклина, эритромицина), при которой оптическая плотность (OD_{600}) культуры *M. smegmatis* mc^2 155 после 18 часов инкубирования культуры в жидкой среде, содержащей антибиотик, не отличалась от OD_{600} культуры *M. smegmatis* mc^2 155, выращенной без антибиотика.

Измерение оптической плотности клеточной суспензии проводили на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad). Эксперимент проведен в трех независимых повторах.

3.5.2. Оценка уровня лекарственной чувствительности

Метод бумажных дисков

Культуру *M. smegmatis*, выращивали в среде Lemco-TW 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 до конечной концентрации 50 мкг/мл, а также, при необходимости – тетрациклин для индукции.

После застывания агара с культурой на чашках, на поверхность агара проводилось наложение бумажных дисков с исследуемым антибиотиком (см.

Приложение А, Таблица 1). Чашки инкубировали при 37°С 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 Lemco-TW (0.1% Tween 80). Оценка роста или его отсутствия проводили визуально и подтверждали спектрофотометрически через 2-3 дня инкубации при 37°С.

Все эксперименты по определению лекарственной чувствительности были проведены в трех независимых повторах.

3.5.3. Получение химически-компетентных клеток *E. coli*

10 мл среды LB инокулировали штаммом *E. coli* и инкубировали в термостатированном в шейкере в течение ночи (~16 часов) при 37ºС и перемешивании при 250 об/мин. Далее клетки засевали (из расчета 1:50) в 10 мл свежей среды LB OD_{600}=0,05. Суспензию инкубировали при 37ºС в шейкере (200-250 об/мин) в течение 1,5-2 часов до достижения оптической плотности OD_{600}=0,15, после чего клетки собирали центрифугированием при 8 000 об/мин в течение 10 мин при +4ºС. Осадок ресуспендировали в 5 мл ледяного раствора $CaCl_2$ 0,1М и инкубировали при +4ºС в течение 40 минут, после чего клетки вновь осаждали центрифугированием 10 мин при 8 000 об/мин и +4ºС. Осадок ресуспендировали в 1 мл раствора $CaCl_2$ 0,1М, затем добавляли стерильный ледяной глицерин до конечной концентрации 10%, делили суспензию на аликвоты по 100 мкл, которые помещали в охлажденные стерильные микропробирки и замораживали при -80ºС.

3.5.4. Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Компетентные клетки оттаивали в ледяной бане в течение 10 мин. После чего в клеточную суспензию добавляли плазмидную ДНК в количестве 1-50 нг, либо весь объем лигазной смеси на 100 мкл суспензии и инкубировали во льду в течение 40 мин. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42ºС в течение 1,5 мин. Далее помещали в ледяную баню на 5 мин. По прошествии этого времени, к клеточной суспензии добавляли 1 мл среды LB и инкубировали 40-60 мин в термостате при 37ºС (1-2 генерации). Суспензию растирали на чашки с агаризованой средой LB, содержащей необходимый антибиотик в качестве селективного агента [Sambrook et al., 1989].

3.5.5. Получение электрокомпетентных клеток *M. smegmatis*

10 мл среды Lemco-TW инокулировали петлей клетками *M. smegmatis*, после чего выращивали при 37ºС и 250 об/мин в течение 1-3 дней до достижения OD_{600}=0,4-0,6. Далее суспензию разводили свежей средой Lemco-TW в 100 раз (до конечного объема 100 мл) и выращивали в тех же условиях 1-2 дня до достижения OD_{600}=0,6-1,0, после чего клетки инкубировали 1,5 часа на ледяной бане (+4ºС) и собирали центрифугированием при 3000×g и +4ºС. Далее клетки промывали заранее охлажденным стерильным 10% раствором глицерина, приготовленным на деионизованной воде (mQ), постепенно уменьшая объем (50-20-10 мл). После этого клетки ресуспендировали в 2 мл 10% глицерина, делали аликвоты по 50 мкл и замораживали при -80ºС.

3.5.6. Электротрансформация компетентных клеток *M. smegmatis*

Аликвоту электрокомпетентных клеток *M. smegmatis* оттаивали на ледяной бане в течение 20 минут, после чего добавляли к ней 0,5-5 мкг плазмидной ДНК в объеме, не превышающем 5 мкл, смешивали

пипетированием и оставляли на льду на 10 минут. После этого смесь переносили в 2 мм кюветы для электропорации фирмы “Bio-Rad” и подвергали электрическому импульсу по программе Ec2 (1 импульс, 2,5 кВ) на приборе MicroPulser («Bio-Rad»). После импульса кювету инкубировали в ледяной бане 10 минут, затем добавляли 1 мл среды Lemco-TW и инкубировали 2-3 часа при 37ºС с периодическим взбалтыванием. 100 мкл суспензии растирали на чашки с агаризованой средой Lemco, содержащей необходимый антибиотик в качестве селективного агента.

3.5.7. ПЦР-скрининг клеток трансформантов

Колонии после трансформации скалывали в 30 мкл H_2O. Смесь для ПЦР готовили как для обычной реакции амплификации. Смесь разносили в пробирки на 0,5 мл по 22 мкл и добавляли по 3 мкл суспензии клеток. Пробирки помещали в амплификатор. Температуру отжига подбирали с учетом длины и состава праймеров (см. раздел 3.5.1.). При скрининге колоний *M. smegmatis*, клетки предварительно инкубировались 40 мин при 95ºС. После завершения амплификации в пробирки добавляли по 5 мкл 6х буфера для нанесения на гель и проводили электрофорез в 1% агарозном геле.

В качестве маркера использовали ДНК фага λ, рестрицированную эндонуклеазами *Eco*RI и *Hind*III.

3.6. Биоинформатические методы и методы статистического анализа данных

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности генов, и их продуктов получены из GenBank NCBI.

Гомологию аминокислотных последовательностей белков исследовали в программе BLAST [Johnson et al., 2008].

Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega [Sievers et al., 2011].

Для построения филогенетических древ использовали программу Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) версии 7.00 [Kumar et al., 2016], древа строили по методу присоединения соседей (neighbour-joining).

Диаграммы Эйлера-Венна строили с использованием ресурса http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/.

Так как переменные, по которым необходимо было определять 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 стандартное отклонение σ^2.

Столбчатые диаграммы строились на основе средних значений диаметров зон ингибирования роста культур клеток *M. smegmatis* mc^2 155.

Анализ адаптированности кодонов проводили в программе Graphical Codon Usage Analyser (GCUA) [Fuhrmann et al., 2004], с использованием базы данных частот встречаемости кодонов [Nakamura et al., 2000].

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1. 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. Одной из самых развитых и обширных систем природной лекарственной устойчивости, резистомом, обладают представители класса Актинобактерий. В настоящей работе рассматриваются два представителя данного класса: *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium smegmatis*. Объектом исследования является резистом *M. tuberculosis*, в частности система транскрипционного фактора WhiB7 (см. Раздел 2.3.10.). В качестве модельного объекта для изучения данной системы использован штамм *M. smegmatis* mc^2 155. При использовании *M. smegmatis* в качестве молельного объекта следует учитывать различия в функциональной нагрузке исследуемых генов по сравнению с *M. tuberculosis*. Этот штамм характеризуется высокой частотой генетической трансформации, высокой скоростью роста (1-3 суток) и безопасностью в работе, по сравнению с *M. tuberculosis*. Однако существуют и минусы работы с данным модельным организмом, в числе которых, отличие в метаболизме, основанное на разнице в скорости роста. Эти отличия приводят, например, к разнице в уровнях устойчивости *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* к некоторым антибиотикам [Altaf et al., 2010] с одной стороны, и наличие большого количества МЛУ- транспортеров у *M. smegmatis*, повышающих устойчивость к ряду антибиотиков с другой стороны. Эти факторы следует учитывать при использовании *M. smegmatis* в качестве модельной системы для изучения механизмов устойчивости. На Рисунке 4.1, представлено филогенетическое дерево рода микобактерий, построенное на основе последовательности гена16S РНК (*rrs*).

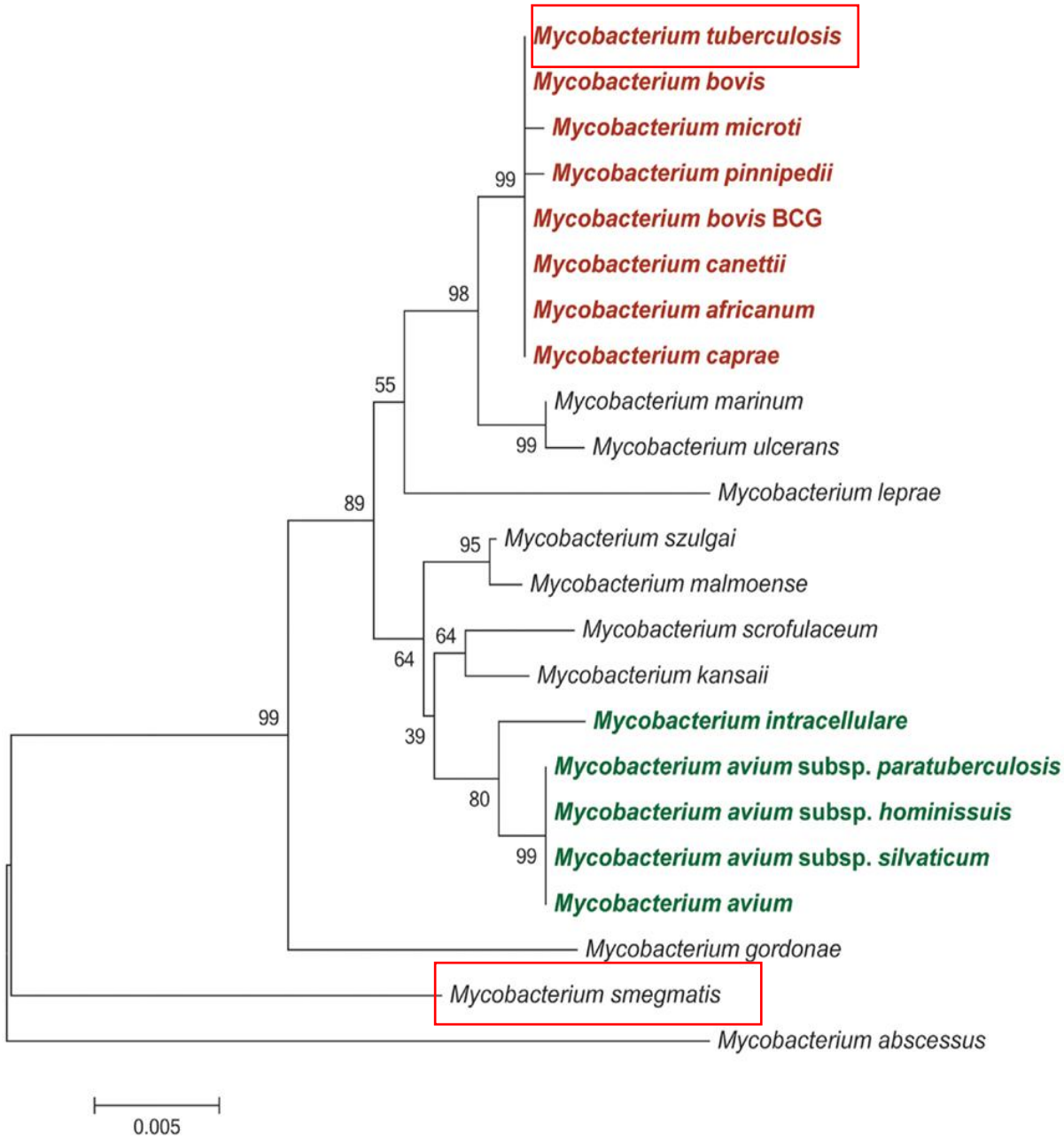


Рисунок 4.1. Филогенетическое древо представителей рода микобактерий. Древо построено на основе последовательности 16S РНК, методом присоединения соседей (Neighbor-joining) и bootstrap, основанным на 1000 псевдоповторностей. Представители *M. tuberculosis* комплекса обозначены красным, *M. avium* комплекс зеленым. *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* выделены красной рамкой.

Таким образом, было необходимо определить, может ли *M. smegmatis* mc^2 155 выступать как модельный организм для изучения генов

резистома *M. tuberculosis*, в частности генов регулона WhiB7, и определить совпадения/различия в основных семействах генов резистома *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*.

4.1.1. Формирование каталога генов природной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*

Каталог генов резистома *M. tuberculosis* был создан благодаря существующим данным по генам, осуществляющим лекарственную устойчивость напрямую. Данный каталог состоит из семейств генов, представленных в Таблице 4.1, полный перечень генов (См. Приложение А, Таблица 2):

Таблица 4.1. Основные семейства генов, использованные в работе

Семейство	**Количество генов**
whiB-like	7
aph, aac (аминогликозидфосфотрансферазы, аминогликозидацетилтрансферазы)	5
Клеточные транспортеры	26
Белки модификаторымишеней/лекарств	4
Прочие	3

На основе созданного каталога генов резистома *M. tuberculosis* была составлена карта генома *M. smegmatis* mc^2 155 и *M. tuberculosis* H37Rv с отмеченными генами резистома обоих микроорганизмов, Рисунок 4.2.

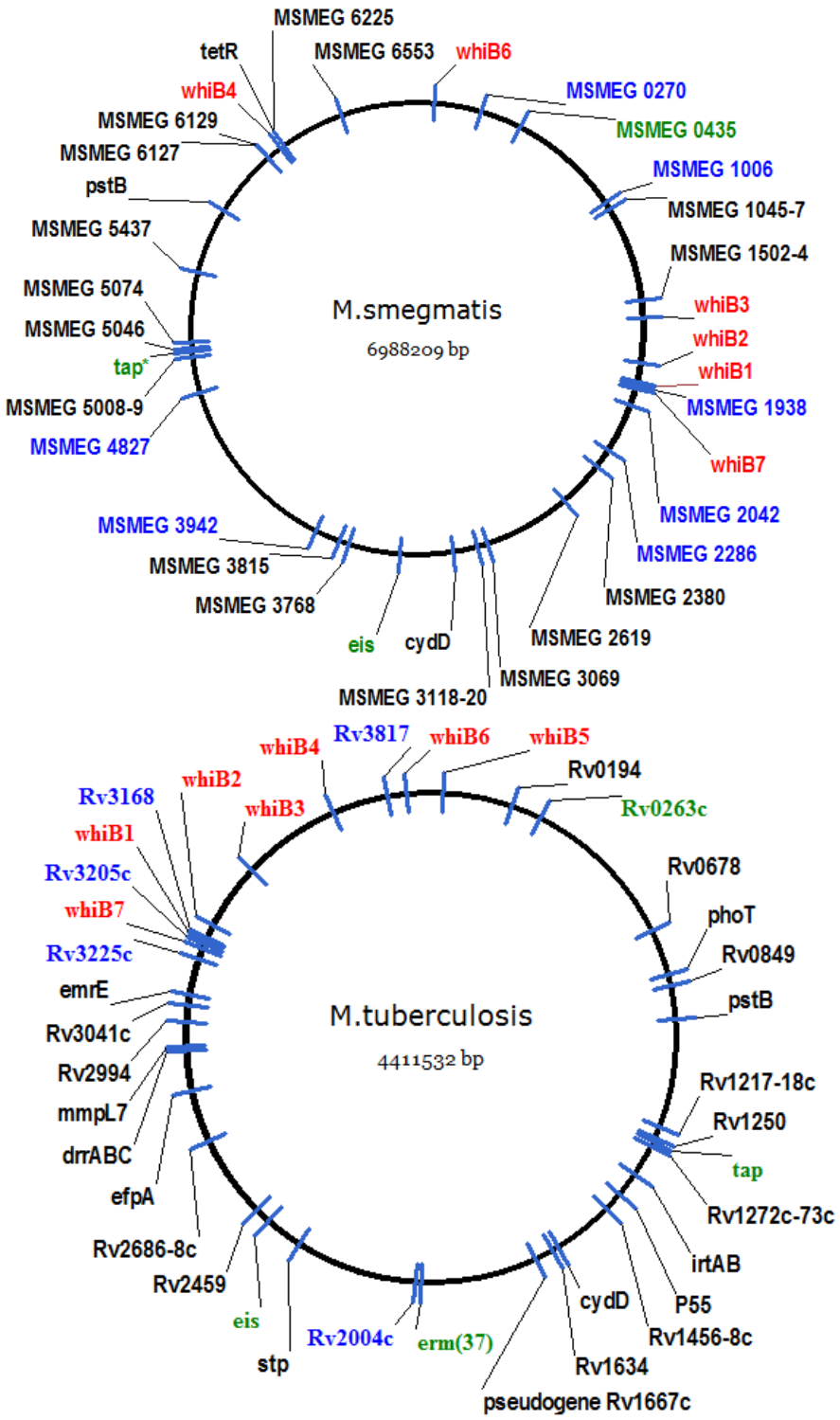


Рисунок 4.2. Схематичное изображение геномов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. smegmatis* mc^2 155 с обозначенными генами-гомологами резистома обоих организмов использованных в анализе. Красным цветом выделены гены семейства *whiB*, зеленым - гены регулона WhiB7, синим - гены аминогликозид фосфотрансфераз. Звездочкой, в составе генома *M. smegmatis* указан псевдоген, аннотированный как гомолог гена *tap*.

Сравнение генов резистома *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* mc^2 155 демонстрирует принципиальное сходство организации резистома обоих организмов, но в то же время и различия, вызванные, по-видимому, условиями жизни микроорганизмов. Например, наличие у *M. smegmatis* большего количества генов аминогликозид фосфотрансфераз, а также эволюцией генов, кодирующих клеточные транспортеры.

С другой стороны наблюдается отсутствие или дефективность ряда генов *M. tuberculosis* у *M. smegmatis*. Возможно, данный процесс расхождения геномов связан с закреплением устойчивого генетического признака исходя из условий окружающей среды, а также силой признака, определяемой данным геном. Отличным примером является ген *tap* регулона WhiB7. У *M. smegmatis* *tap* является псевдогеном в отличие от *M. tuberculosis* (См. Приложение А, Таблица 2, Приложение Б, Рисунок 1).

Таким образом, можно заключить, что *M. smegmatis* mc^2 155 обладает схожей организацией резистома и может служить модельным организмом для изучения генов природной лекарственной устойчивости, использованных при проведении сравнительного анализа резистомов *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* (Таблица 4.1).

Объектом исследования в данной работе является транскрипционный фактор WhiB7 *M. tuberculosis*, а также гены его регулона. Таким образом, для исследования влияния гена *whiB7* и генов его регулона на уровень лекарственной устойчивости было необходимо провести проверку адекватности модельного объекта *M. smegmatis* mc^2 155 для изучения регулона WhiB7.

Как показано на Рисунке 4.2 в геноме *M. smegmatis* есть ортолог гена *whiB7* *M. tuberculosis*. Детальное сравнение аминокислотных последовательностей, Рисунок 4.3, показало идентичность белковых последовательностей 68% и полную гомологию по ключевым доменным структурам белков.

```
MSMEG_WB7     MSIAMTAPTTGVAPMTCETRLPAVPCHVGDPDLWFAENPGDLERAKALCAGCPIRVQCLT
MTUBER_WB7    ------------MSVLTVPRQTPRQRLPVLPCHVGDPDLWFADTPAGLEVAKTLCVSCPIRRQCLA

MSMEG_WB7     AALERQEPWGVWGGEILDRGSIVARKRPRGRPRKDSGGNPAAA
MTUBER_WB7    AALQRAEPWGVWGGEIFDQGSIVSHKRPRGRPRKDAVA-----
```

Рисунок 4.3. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков WhiB7 у *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. MSMEG_WB7 – WhiB7 *M. smegmatis* mc^2 155 (MSMEG_1953); MTUBER_WB7 – WhiB7 *M. tuberculosis* H37Rv (Rv3197A). Красным цветом отмечен A/T-крючок, желтым – четыре консервативных цистеина [Fe-Su] кластера, зеленым – триптофан/глицин богатый мотив.

Как видно из выравнивания аминокислотной последовательности двух белков, они являются гомологами и имеют одинаковые консервативные структурные элементы. Таким образом, несмотря на небольшое различие в размере, белок MSMEG_1953 гомологичен белку WhiB7 *M tuberculosis*.

Анализ нуклеотидных последовательностей двух других исследуемых генов регулона WhiB7, показал отсутствие гомологичного, функционального ортолога гена *tap* в составе генома *M. smegmatis* (Рисунок 4.2). Данный ген (*MSMEG_5033*) аннотирован как псевдоген и содержит сдвиг рамки считывания (инсерцию) в начале нуклеотидной последовательности гена.

Также был обнаружен ортолог гена *Rv1473* в составе генома *M. smegmatis* – *MSMEG_3140* (Рисунок 4.2) и проведено сравнение аминокислотных последовательностей кодируемых белков. Выравнивание аминокислотных последовательностей двух белков показало степень идентичности 88% и совпадение всех доменных структур двух исследуемых белков.

Таким образом, были обнаружены гены-ортологи *whiB7* и *Rv1473*, в составе генома *M. smegmatis*, а также псевдоген *tap*.

В дальнейшем данный каталог генов был использован в качестве базы для проведения поиска мутантов *M. tuberculosis* по выбранным генам, а также

исследования наличия связи между мутациями и такими характеристиками как: филогенетическая принадлежность и лекарственная устойчивость.

4.1.2. Оценка связи между мутациями в генах природной лекарственной устойчивости и линией или фенотипом лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

Изоляты микобактерий туберкулеза подразделяются на несколько групп по своему происхождению и различающихся фенотипически. Для их идентификации применяется несколько различных методик, использующих соответствующие генетические маркеры. К таким методам относятся: MIRU-VNTR [Weniger et al., 2010], сполиготипирование [Soolingen van et al., 1995], типирование основанное на мутациях в генах семейства токсин-антитоксин [Zaychikova et al., 2015] или в генах домашнего хозяйства [Homolka et al., 2010]. В целом можно представить древо расхождения изолятов *M. tuberculosis* как филогенетическое древо с двумя кладами, представленное на Рисунке 4.4.

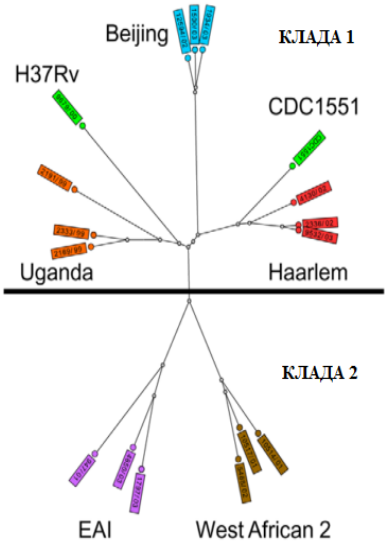


Рисунок 4.4. Радиальное древо изолятов *M. tuberculosis*, основанное на MIRU-VNTR по 24 локусам и 43 спейсерам сполиготипирования [Homolka et al., 2010].

Для получения полной картины полиморфизма генов резистома *M. tuberculosis* была разработана и использована программа, написанная на языке программирования “Perl” в лаборатории генетики микроорганизмов Михеечевой Натальей Евгеньевной. Для анализа была создана выборка доступных для анализа в базе данных GenBank NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) геномов *M. tuberculosis* в размере 1740, Также были определены мутации, приводящие к возникновению приобретенной лекарственной устойчивости (https://tbdreamdb.ki.se/Info/).

Для оценки силы связи между мутациями в генах регулона WhiB7 и филогенетической принадлежностью или фенотипом лекарственной устойчивости штаммов *M. tuberculosis*, представленных в GenBank NCBI, была расчитана корреляция между мутациями в генах регулона WhiB7 и филогенентической линией штамма *M. tuberculosis* либо его фенотипом устойчивости (мутацией в гене мишени лекарств). Генотип штаммов *M. tuberculosis* был определен с использованием метода точковых мутаций в генах системы TA II типа [Zaychikova et al., 2015].

Корреляционный анализ мутаций генов WhiB7-регулона и принадлежностью исследуемой выборки ДНК штаммов *M. tuberculosis* показал значимую статистическую связь только для двух генов WhiB7 регулона: *whiB7* и *tap*. В Таблице 4.2 приведены исследуемые штаммы, а также частоты обнаружения мутаций в генах *whiB7* и *tap*.

Таблица 4.2. Представленность SNPs генов регулона WhiB7 среди штаммов *M. tuberculosis*

Линия	Сублиния	Количество штаммов	Количество штаммов с SNPs*,** в гене *tap*	Процент SNPs в линии, %	Количество SNPs* в гене *whiB7*
Beijing	**Beijing-ancestral**	**175**	**34**	**19,4**	**0**
	Beijing-modern	**297**	**296**	**100.0**	**4**
	Beijing-modern-B0/W148	**86**	**85**	**100.0**	**0**
Cameroon		**6**	**0**	**0.0**	**0**
Haarlem		**49**	**5 (4**+1)**	**10.2**	**0**
X		**80**	**2**	**2.5**	**0**
LAM	**LAM**	**311**	**2**	**1.3**	**0**
	F15/LAM4/KZN	**150**	**0**	**0.0**	**2**
	LAM1	**30**	**7**	**22.6**	**0**
	LAM2	**9**	**0**	**0.0**	**0**
SMI		**5**	**0**	**0.0**	**0**
Ural		**83**	**0**	**0.0**	**0**
Ghana		**37**	**0**	**0.0**	**0**
S		**109**	**0**	**0.0**	**0**
EAI	**EAI**	**180**	**25 (17+8)**	**13.9**	**3**
	EAI-Manila	**19**	**19****	**100.0**	**19**
Deli-CAS		**103**	**2**	**1.9**	**0**
H37Rv-like		**12**	**0**	**0.0**	**0**
ВСЕГО		**1740**	**477**	**30.2**	**25**

- *Несинонимичные SNP.

- **Синонимичные мутации.

Поиск функционально-значимых мутаций позволил выявить только одну мутацию, способную влиять на функцию белка WhiB7 – делецию гуанина в

позиции 191. Делеция G191 приводит к сдвигу рамки считывания непосредственно перед A/T-«крючком» (см. Рисунок 4.3), таким образом, мутантный белок теряет способность к инициации транскрипции. Данная мутация свойственна представителям линии EAI-Manila, Таблица 4.3.

Детальный анализ корреляций мутаций демонстрирует, что среди 1740 последовательностей гена *tap* наиболее часто встречающейся мутацией является инсерция C_{581}. 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 C_{581} в группе Beijing-ancestral и 100% - в более молодых группах Beijing-modern и B0/W148 (Таблица 4.2). Помимо инсерции, ассоциированной с группой Beijing, был обнаружен ряд других SNPs, часть которых может быть ассоциирована с определенными линиями/сублиниями, Таблица 4.3.

Таблица 4.3. Мутации в гене *tap*, ассоциированные с различными филогенетическими группами

Мутация	Филогенетическая линия *M. tuberculosis*	Коэффициент корреляции *r*	95% доверительный интервал*
InsC581	Beijing	0,81	0,79-0,82
T(504)A	EAI	0,22	0,18-0,27
G(838)C	EAI	0,29	0,25-0,33
T(1029)C	EAI-Manila	0,97	0,97-0,98
T(528)C	Haarlem	0,28	0,24-0,32

* p-value<0.001

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

Связи между фенотипом лекарственной устойчивости и мутациями в генах регулона WhiB7 выявлено не было.

Таким образом, были выбраны две мутации генов регулона WhiB7 – делеция G_{191} в гене *whiB7* и в гене *tap* – $insC_{581}$. Особенностью данных мутаций является то, что они являются функциональными маркерами микроэволюции филогенетических линий EAI – EAI-Manila (*whiB7*ΔG_{191}), а также Beijing – Beijing-modern.

4.1.3. Поиск мутаций генов регулона WhiB7 у клинических изолятов *M. tuberculosis*

Для проведения поиска мутаций в генах WhiB7 регулона нами была использована коллекция ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*, предоставленная ЦНИИ Туберкулеза (http://critub.ru/), представляющая собой выборку изолятов, характеризующихся различным уровнем лекарственной устойчивости и анамнезом.

Данная коллекция состоит из 64 образцов ДНК *M. tuberculosis*, выделенных из пациентов, разделенных на две группы Таблица 4.4.

Таблица 4.4. Коллекция клинических изолятов *M. tuberculosis*

Группа	Количество изолятов	Лекарственная устойчивость		
		Моно- и Полирезистентные	МЛУ	ШЛУ
А	41	6	25	10
Б	23	0	0	0
Всего	**64**	**6**	**25**	**10**

Геномная ДНК изолятов *M. tuberculosis* была выделена в ЦНИИ Туберкулеза, Москва. Данная коллекция, более подробно, описана в работе [Maslov et al., 2015]. Группа А – 41 изолят, выделенный у пациентов, с

наличием лекарственной устойчивости, группа Б – 23 изолята, выделенные от пациентов, с лекарственной чувствительностью ко всем исследуемым препаратам.

Изоляты-источники ДНК были паспортизированы (См. Приложение В, Таблица 1), для этого был определен спектр лекарственной устойчивости каждого из них, а также определена филогенетическая принадлежность каждого из образцов к определённой линии методом сполиготипирования по 43 спейсерам и MIRU-VNTR по 24 локусам.

Используя метод сполиготипирования по 43 спейсерам, были определены сполиготипы для всех исследуемых изолятов: 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 были определены. Также в результате сполиготипирования были обнаружены 2 ранее не известных сполиготипа (См. Приложение В, Таблица 2).

В качестве дополнительного контроля было проведено генотипирование клинических изолятов с использованием метода MIRU-VNTR24, изоляты были разделены на различные филогенетические группы, Рисунок 4.5.

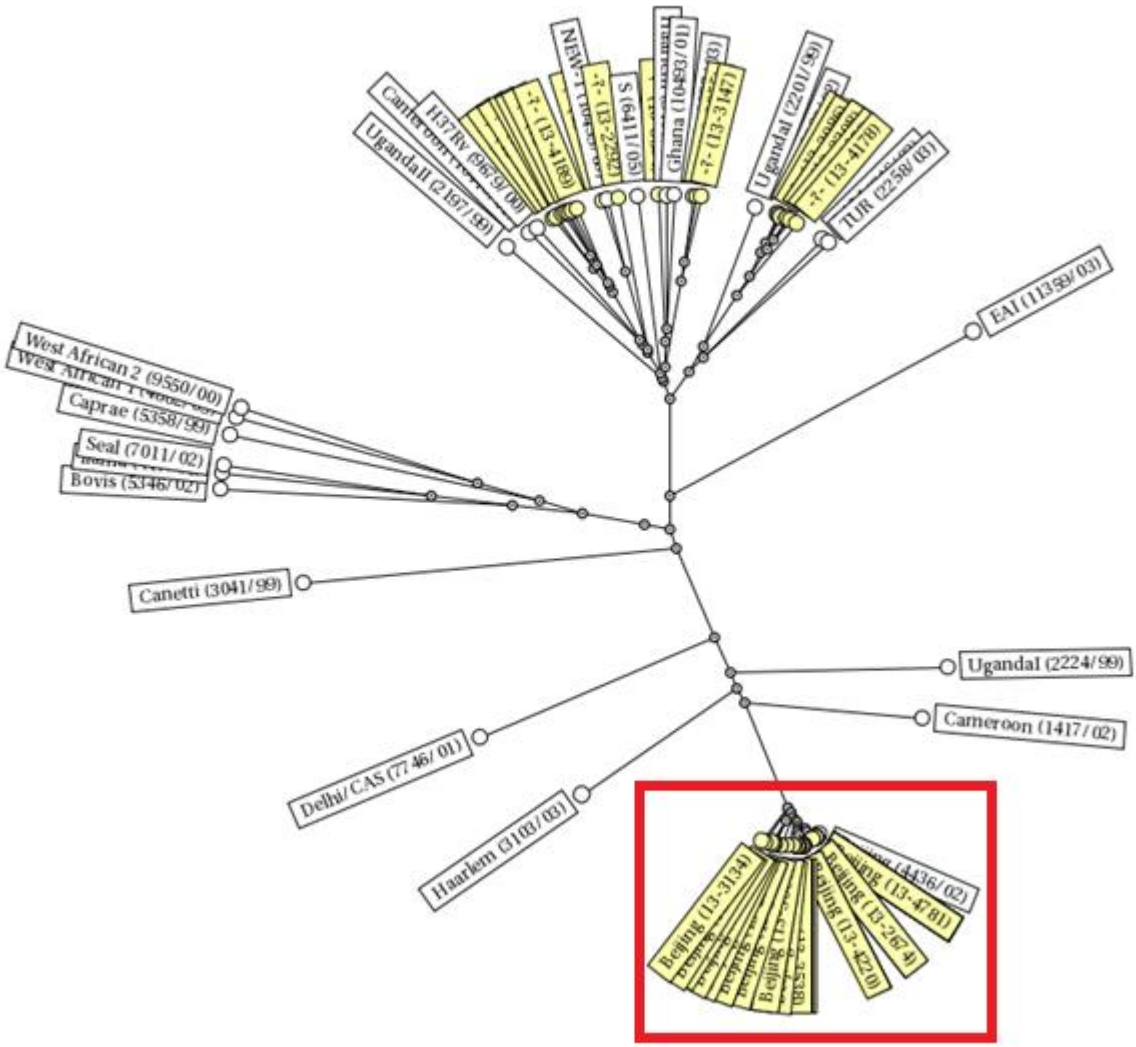


Рисунок 4.5. Филогенетическое UPGMA-древо изолятов *M. tuberculosis*. Древо построено с использованием данных профиля MIRU-VNTR24 для каждой филогенетической группы с использованием программы http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/searchdb.faces. Красной рамкой, выделены изоляты, относящиеся к линии Beijing.

Итоговое распределение изолятов *M. tuberculosis* по профилю MIRU-VNTR, с использованием программы «MIRU-VNTR*plus*», было следующим: 71,4% изолятов относится к группе Beijing, 9,5% к LAM, 3% к S и Cameroon,

3,17% к URAL и у 11% изолятов не удалось определить принадлежность (См. Приложение В, Таблица 3).

Анализируя полученные данные генотипирования коллекции, нами был сделан вывод о том, что на территории центрального региона РФ преобладает *M. tuberculosis* линии Beijing, что коррелирует с эпидемиологическими данными этого региона, а также с использованием метода MIRU-VNTR установлено наличие более редких линий.

Для поиска мутантных вариантов генов *whiB7, tap, Rv1473* были использованы образцы ДНК клинических изолятов всех выявленных линий. В связи с тем, что на сегодняшний день точная функциональная нагрузка гена *Rv1473* не исследована, данный ген регулона WhiB7 был включен в анализ полиморфизма генов регулона WhiB7 у клинических изолятов *M. tuberculosis*.

Задачей этого этапа был поиск редких мутаций в данных генах, у редких линий *M. tuberculosis*, а также анализ распределения мутаций характерных для линии Beijing в случайной выборке клинических изолятов.

Для проведения поиска полиморфизмов в генах *whiB7, tap* и *Rv1473* было проведено секвенирование данных генов, амплифицированных с геномных ДНК, с использованием соответствующих праймеров (Таб. 1 Прил. Б). В результате были получены следующие данные, представленные в Таблице 4.5.

Таблица 4.5. Мутации в генах регулона WhiB7

Группа	Количество изолятов, шт.	Мутации в гене *whiB7*, шт.	Мутации в гене *tap*, шт.	Мутация в гене *Rv1473*, шт.
A	41	0	32	2
B	23	0	14	1

Таким образом, в коллекции клинических изолятов, нами были обнаружены мутации в генах *tap* – insC581 и *Rv1473* (C422T, $insC_{350}$, $insG_{320}$).

Также, в связи с тем, что в гене *whiB7* мутаций найдено не было, нами был выбран для изучения аллельный вариант гена, несущий делецию - ΔG_{191}, как единственную, функционально значимую мутацию (См. Раздел 4.1.3).

4.1.4. Сравнительный геномный анализ клинических изолятов *M. tuberculosis*

Другой выборкой для поиска и анализа полиморфизма генов природной лекарственной устойчивости, в частности, генов регулона WhiB7, стала коллекция клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенная от пациентов из различных регионов России. В работе использовались 7 изолятов *M. tuberculosis*, охарактеризованных по фенотипу лекарственной устойчивости Таблица 4.6.

Таблица 4.6. Секвенированные геномы *M. tuberculosis*

Геном *M. tuberculosis*/ номер в GenBank	Фенотип устойчивости*	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

*- полное название антибиотиков приведено в Таблице 1.2

Геномы, приведенные в Таблице 4.6, были нами секвенированы для поиска ранее неописанных мутаций в генах природной лекарственной устойчивости и проведения их сравнительного анализа.

Таким образом, наличие секвенированных геномов клинических изолятов *M. tuberculosis* с различными фенотипами устойчивости позволило провести подробный анализ ДНК с целью поиска мутаций в генах природной и приобретенной лекарственной устойчивости [Prozorov et al., 2014].

Нами была составлена диаграмма сходства и различия мутаций в данных геномах. Данная диаграмма необходима для понимания гетерогенности/гомогенности изолятов и для проведения первичной оценки отличий между геномами с различными характеристиками лекарственной устойчивости и вирулентности, относящиеся к филогенетической группе Beijing, Рисунок 4.6.

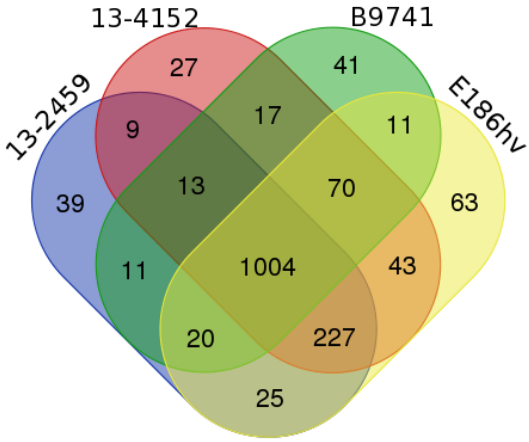


Рисунок 4.6. Диаграмма Эйлера-Венна для 4 множеств SNPs секвенированных геномов *M. tuberculosis* филогенетической линии Beijing-B0/W148. *M. tuberculosis* E186hv, *M. tuberculosis* 13-2459, *M. tuberculosis* 13-4152, *M. tuberculosis* B9741.

Как следует из диаграммы, представленной на Рисунке 4.6, 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 одинаковых мутаций, равным 1004. Таким образом, клинические изоляты, относящиеся к сублинии Beijing-B0/W148, показывают довольно высокую гомогенность.

Найденные стандартные мутации, приводящие к возникновению лекарственной устойчивости, совпали с фенотипами устойчивости, Таблица 4.7.

Таблица 4.7. Фенотип и стандартные мутации в генах, приводящие к лекарственной устойчивости у клинических изолятов *M. tuberculosis*

Штамм	Фенотип устойчивости*	Мутации, приводящие к лекарственной устойчивости к антибиотикам**								
		INH	RIF	EMB	ETH	PZA	STR	AMI	FQL	PAS
E186hv	H;R;E;Z;Fq	katG(G1388T), katG(G944C)	*rpoB* (C1349T; T2192C; T 3225C)	*embA* (A114G; C228T); *embB* (C1441A)		*pncA*ΔG 400; *rpsA*(A636C)				
13-2459	H;R;E;Z;Et;A;Fq	katG(G1388T), katG(G944C)	*rpoB* (C1349T)	*embA* (A114G; C228T); *embB* (G870A)	*inhA*(A61G)	*rpsA*(A636C)			*gyrA*(G61C; G284C; G2003A)	
13-4152	H;R;Z;E;A;Fq	katG(G1388T), katG(G944C)	*rpoB* (C1349T; T 3225C)		*ethA*ΔA110	*rpsA*(A636C)		*tlyA*(A33G)	*gyrA*(G61C; G284C; G2003A); *gyrB*(T617G)	
B9741	H;R;S;E;Z	katG(G1388T), katG(G944C)	*rpoB* (C1349T; T 3225C)	*embA* (A114G; C228T); *embB* (A838C)		*pncA*(G311T); *rpsA*(A636C)	*gidB*(A276C; A615G); *rpsL*(A128G)			
EKB_8	H;R	katG(G1388T), katG(G944C)	*rpoB* (T1289C; C1333A; T 3225C)							
13-3935										
T11555	H; R; S; Z; E; Et; K; PAS; A; Fq	katG(G944C)	*rpoB* (C1349T)	*embB* (G870A); *Rv0340* (C90T)			*gidB*(T47G; C483G); *rpsL*(A128G)	*tlyA*(A33G)	*gyrA*(G61C; G284C; G739A; G2003A)	thyA(A604G)

*- полное название антибиотиков приведено в Таблице 1.2;

**- использованы данные https://tbdreamdb.ki.se/Info/.

Далее, для более детального анализа распределения мутаций среди геномов Beijing-B0/W148 были использованы конкретные наборы генов: белков клеточной стенки, липопротеинов, метаболизма жирных кислот,

синтеза миколовых кислот, катаболизма холестерола, белков-ингибиторов антимикробного ответа макрофагов, сигма факторов, двухкомпонентных систем, ТА систем, СТПК, систем секреции VII типа (ESX VII), протеаз, белков клеточного транспорта, а также генов WhiB и генов WhiB7 регулона и др. (см. Приложение А, Таблица 3).

Таким образом, была построена диаграмма распределения несинонимичных мутаций, представленная на Рисунке 4.7. В качестве референсной последовательности ДНК была использована ДНК *M. tuberculosis* W148 [Mokrousov et al., 2012].

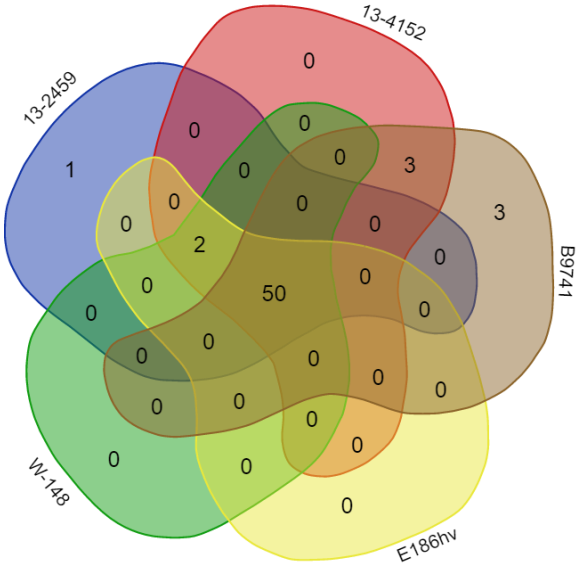


Рисунок 4.7. Диаграмма Эйлера-Венна для 5 множеств несинонимичных SNPs секвенированных геномов *M. tuberculosis* линии Beijing-B0/W148. *M. tuberculosis* E186hv, *M. tuberculosis* 13-2459, *M. tuberculosis* 13-4152, *M. tuberculosis* B9741.

В результате показано, что филогенетическая группа Beijing-B0/W148 является генетически достаточно однородной. Исключение составляет геном B9741, имеющий три мутации в гене *mce1F* - одном из генов вирулентности микобактерий [Casali et al., 2006], а также геном 13-2459, несущий мутацию в гене двухкомпонентной сигнальной трансдуцирующей системы *phoPR* – *phoR*, участвующей в вирулентности и патогенезе у *M. tuberculosis* [Walters et al.,

2006]. Все уникальные мутации в генах лекарственной устойчивости, антибиотикотолерантности и вирулентности, представлены в Таблице 4.8.

Таблица 4.8. Уникальные мутации в геномах секвенированных штаммов *M. tuberculosis*

Ген / Геном	13-2459	B9741
mce1F	н/д	896: T->G (X->G) 1252: C->G (R->G) 1255: G->T (V->F)
phoR	242: T->C (F->S)	н/д

Следует особо подчеркнуть, что в данном случае, несмотря на географическую удаленность друг от друга изолятов *M. tuberculosis*, наблюдается сходство их нуклеотидных последовательностей.

4.1.5. Биоинформатическая оценка влияния отобранных аллельных вариантов генов регулона WhiB7 на функциональную активность кодируемых ими белков

Был проведен анализ влияния мутаций (*whiB7*ΔG_{191}, *tap*(insC_{581}) и *Rv1473* (C422T)) на функциональную активность кодируемых ими белков. На Рисунке 4.9 изображено выравнивание аминокислотных последовательностей белка WhiB7 с делецией (*whiB7*ΔG_{191}) и аминокислотной последовательностью функционального белка:

```
T17   GDPDLWFADTPAGLEVAKTLCVSCPIRRQCLAAALQRAEPW-AFG--------VVRYS-TKARS------
T92   GDPDLWFADTPAGLEVAKTLCVSCPIRRQCLAAALQRAEPW-AFG--------VVRYS-TKARS------
T46   GDPDLWFADTPAGLEVAKTLCVSCPIRRQCLAAALQRAEPW-AFG--------VVRYS-TKARS------
H37Rv GDPDLWFADTPAGLEVAKTLCVSCPIRRQCLAAALQRAEPWGVWGGEIFDQGSIVSHKRPRGRPRKDAVA
```

Рисунок 4.8. Выравнивание аминокислотных последовательностей WhiB7 штаммов *M. tuberculosis* T17, T46, T92, из группы EAI-Manilla и штамма H37Rv.

Как представлено на Рисунке 4.8, у данных штаммов, относящихся с филогенетической линии EAI-Manila, произошел сдвиг рамки считывания, образование STOP-кодона и предположительно образование нефункционального белка, с отсутствующей структурой A/T-крючка (Рисунок 2.5.). Таким образом, синтезируемый мутантный белок WhiB7, вероятно не может связываться с ДНК и активировать транскрипцию.

Другим отобранным геном стал ген *tap*, несущий инсерцию C (цитозин) в позиции 581, Рисунок 4.9.

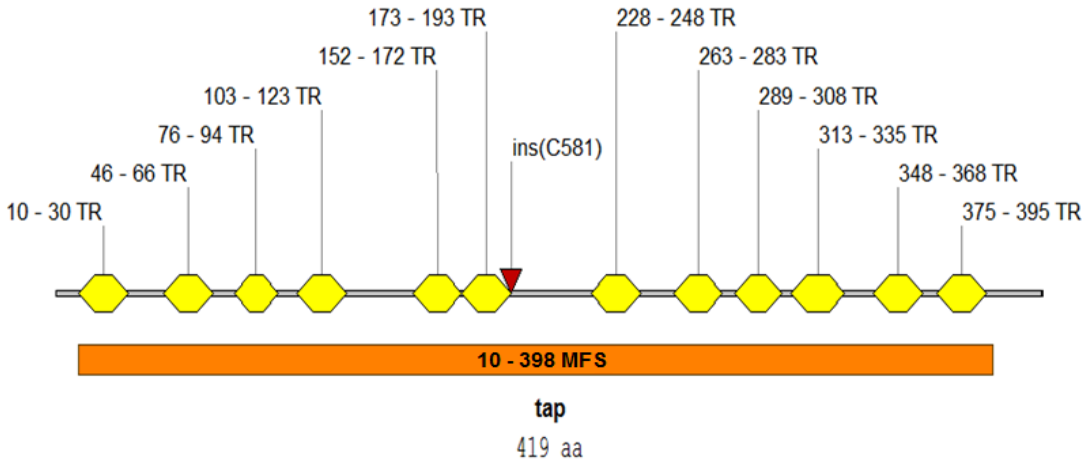


Рисунок 4.9. Аминокислотная последовательность белка Tap. На рисунке обозначено: последовательность белка Tap *M. tuberculosis* H37Rv; желтыми шестиугольниками обозначены трансмембранные домены (TR) с их позициями, указана протяженность MFS домена – оранжевый прямоугольник, а также обозначено место инсерции нуклеотида цитозина.

Инсерция в центральной части синтезируемого белка приводит к сдвигу рамки считывания гена и, по-видимому, образованию дефектного белка мембранного транспортера с отсутствующим, нормально сформированным каналом транспорта.

В гене *Rv1473* нами были обнаружены две инсерции G_{350} и C_{320}, приводящие к сдвигу рамки считывания, а также аминокислотная замена A141V, Рисунок 4.10.

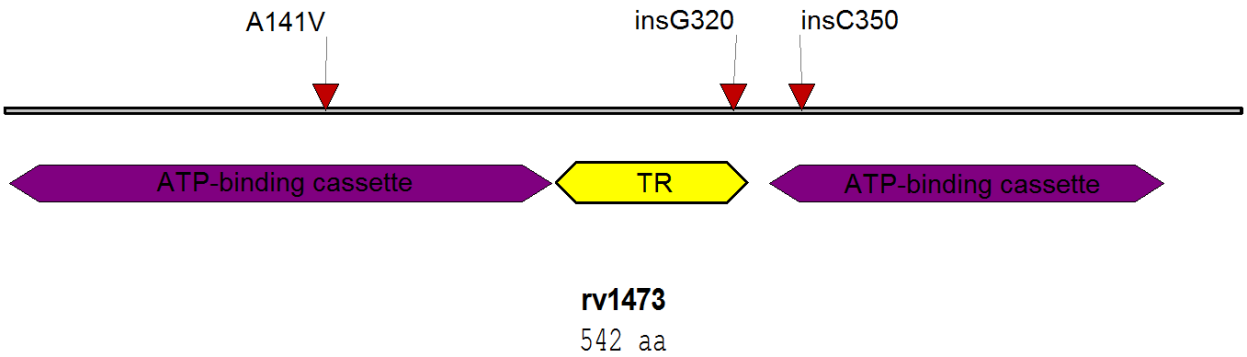


Рисунок 4.10. Картирование мутаций белка Rv1473. Протяженность белка составляет 542 а/к. остатка; фиолетовым отмечены АТФ-связывающие кассеты; желтым – трансмембранный домен (TR) [Braibant et al., 2000]. Стрелками указано место замены или инсерции.

В связи с тем, что белок Rv1473 является представителем класса ABC-транспортёров, которые характеризуются наличием двух АТФ-связывающих кассет – обе инсерции приводят к полной потере функциональности у мутантных форм белка [Braibant et al., 2000]. Такие варианты из-за произошедшего сдвига рамки считывания гена *Rv1473* (вследствие инсерций) являются нефункциональными и не представляют интереса для исследования.

Хотя аминокислотная замена A->V и является заменой алифатических аминокислот, без кардинального изменения химических свойств, валин, как аминокислота с более разветвленной углеводородной цепочкой, может изменить способность к связыванию данного домена.

4.1.6. Заключение к разделу 4.1.

M. smegmatis является удобным модельным объектом для изучения системы природной лекарственной устойчивости. Все основные группы генов резистома *M. tuberculosis* имеют свои ортологи в составе генома *M. smegmatis*.

Поиск, направленный на выявление функционально значимых мутаций в генах природной лекарственной устойчивости, связанных с генотипом (филогенетической принадлежностью), выявил аллельный вариант гена *whiB7* – *whiB7*ΔG_{191}, связанный (r=0,92) с филогенетической группой (линией) EAI-Manilla, а также аллельный вариант гена клеточного транспортера *tap* – *tap*(insC_{581}), являющийся характерным для филогенетической линии Beijing (r = 0.81). Клеточный транспортер *tap* потенциально может считаться маркером эволюции генотипической линии Beijing.

Основываясь на результатах, полученных при проведении биоинформатического поиска мутаций в генах регулона WhiB7, был проведен анализ коллекции ДНК, выделенной из клинических изолятов *M. tuberculosis*, с целью поиска мутаций генов регулона WhiB7: *whiB7*, *tap*, *Rv1473* (клеточный транспортер) для сравнения данных, полученных на выборке из депонированных геномов *M. tuberculosis* (GenBank, NCBI), а также поиска мутаций в малоизученном гене, клеточного транспортера Rv1473. Для анализа связи мутаций в генах регулона WhiB7 с генотипом клинических изолятов *M. tuberculosis* было проведено их генотипирование с использованием метода сполиготипирования и, для уточнения MIRU-VNTR (по 24 локусам).

Секвенирование ДНК, позволило обнаружить мутации в гене *tap* – insC581 (у представителей генотипа Beijing) и три мутации в гене *Rv1473* - C422T, insC_{350}, insG_{320}. Также для поиска мутаций в генах природной лекарственной устойчивости было проведено полногеномное секвенирование клинических изолятов *M. tuberculosis*, обладающих различными фенотипическими характеристиками и географией выделения, и проведен их

сравнительный геномный анализ. Показано, что геномы изолятов филогенетической группы Beijing-B0/W148 довольно сходны по своим последовательностям ДНК, но имеют некоторые различия в «генах» вирулентности, антибиотикотолерантности и лекарственной устойчивости.

Таким образом, для проведения дальнейшего функционального анализа генов *whiB7*, *tap* и *Rv1473* на уровень лекарственной устойчивости были отобраны, помимо генов *whiB7*, *tap* и *Rv1473 M. tuberculosis* H37Rv, еще три мутантных варианта: *whiB7*ΔG_{191}, *tap*(insC_{581}) и *Rv1473*(C422T). Выбор был сделан, исходя из того, что данные мутации имеют непосредственное или потенциальное влияние на функциональную активность кодируемых белков и для проведения более глубокого исследования влияния активности генов *whiB7*, *tap* и *Rv1473* на уровень лекарственной чувствительности *M. smegmatis*.

4.2. Оценка влияния генов регулона WhiB7 на уровень лекарственной устойчивости

Для оценки уровня лекарственной устойчивости, опосредованной генами регулона WhiB7 был проведен анализ сверхэкспрессии генов *whiB7*, *tap* и *Rv1473*, а также их аллельных вариантов *whiB7*ΔG_{191}, *tap*(insC_{581}) и *Rv1473*(C422T).

4.2.1 Клонирование генов регулона WhiB7 в *M. smegmatis*

В качестве вектора для гетерологической экспрессии генов в клетках *M. smegmatis* был использован челночный экспрессионный плазмидный вектор pMIND с делетированным геном устойчивости к канамицину – pMIND Km- [Bekker et al., 2015]. В связи с тем, что число копий данной плазмиды в клетках *M. smegmatis* варьирует от 2 до 5, отбор клонов и наработка готовых генетических конструкций, проводились с использованием клеток *E. coli* DH5α, с маркером селекции - гигромицин Б - и последующим отбором

целевых клонов. Последовательности наработанных готовых генетических конструкций определяли с помощью секвенирования по Сенгеру целевых генов.

Для исследования влияния гена *whiB7*, а также его аллельного варианта, методом сайт-направленного мутагенеза был создан ген *whiB7*, несущий делецию G (гуанин) в позиции 191.

Для анализа влияния мутаций в генах *tap* и *Rv1473* была использована геномная ДНК *M. tuberculosis* H37Rv и ДНК клинических изолятов *M. tuberculosis*, в геномах которых были обнаружены мутации в интересующих нас генах. Все гены и их аллельные варианты были клонированы в вектор pMIND: Km- (Таблица 4.9).

Трансформанты *M. smegmatis* mc^2 155, несущие как контрольную pMIND Km-, так и созданные на ее основе генетические конструкции (Таблица 4.9.) анализировали на изменение уровня лекарственной чувствительности методом бумажных дисков.

Таблица 4.9. Генетические конструкции, использованные в работе

Генетическая конструкция	Содержимый ген	Предполагаемый фенотип
pMINDKm-	-	*w.t.*
pMWB7	*whiB7*	Уменьшение лекарственной чувствительности
pMWB7M	*whiB7*ΔG_{191}	Возврат к *w.t.*
pMTAP	*tap*	Уменьшение лекарственной чувствительности
pMTAPM	*tap*(insC_{581})	Возврат к *w.t.*
pMRV	*Rv1473*	Уменьшение лекарственной чувствительности
pMRVM	*rv1473* (C422T)	Изменение/отсутствие изменения лекарственной чувствительности

w.t. – дикий тип

4.2.2. Влияние сверхэкспрессии гена *whiB7* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis*

Для оценки влияния сверхэкспрессии гена *whiB7* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis* были использованы антибиотики 8 различных химических классов (всего 33 антибиотика). Для анализа, были использованы как контрольные антибиотики для индукции WhiB7 (хлорамфеникол, макролиды и аминогликозиды), так и антибиотики абсолютно других классов – фторхинолоны, β-лактамы и другие (см. Приложение А, Таблица 1). Данный выбор был необходим для поиска нового спектра устойчивости, определяемого экспрессией гена *whiB7*. На Рисунке 4.11, показано изменение уровня лекарственной чувствительности при сверхэкспрессии гена *whiB7*.

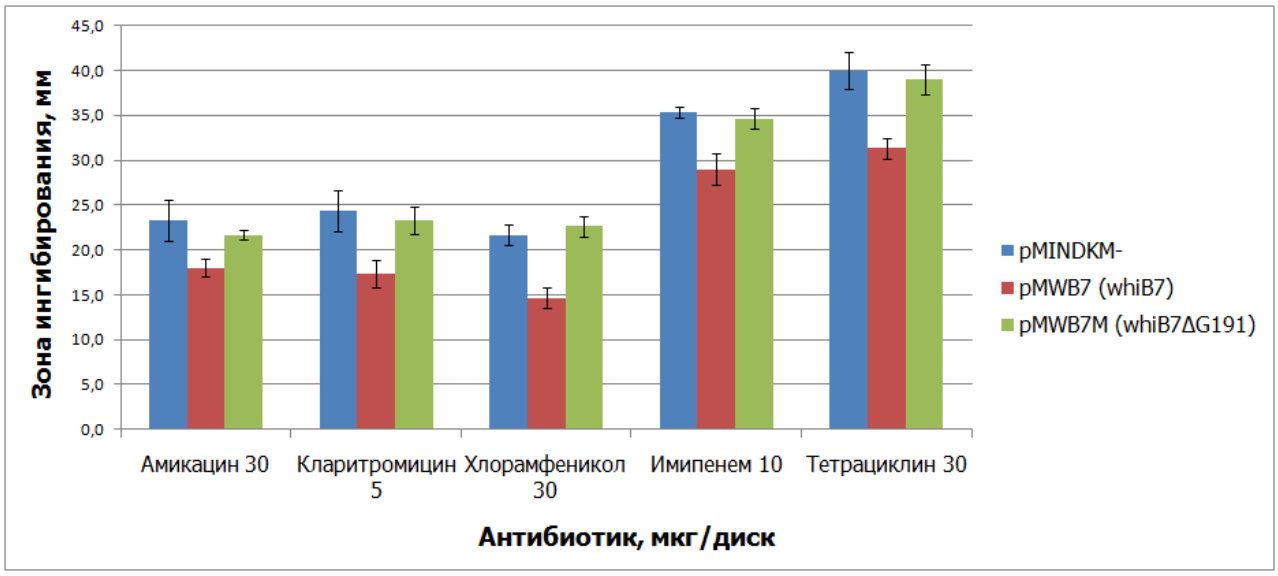


Рисунок 4.11. Зоны ингибирования роста трансформантов *M. smegmatis*. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Сравнительный анализ зон ингибирования роста культур *M. smegmatis*, содержащих pMWB7 и pMWB7M показал увеличение уровня лекарственной устойчивости культуры, содержащей ген *whiB7* к антибиотикам различных химических классов: амикацину - аминогликозиды, кларитромицину – макролиду, хлорамфениколу, тетрациклину и имипенему - β-лактамному

антибиотику. 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*ΔG_{191}, относительно культуры с *whiB7*, подтверждает возврат к фенотипу *w.t.* Для других антибиотиков статистически значимых различий в уровне лекарственной чувствительности не обнаружено.

4.2.3. Влияние сверхэкспрессии гена *tap* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis*

Вторым исследуемым геном WhiB7-регулона был *tap* и его аллельный вариант *tap*(insC_{581}). Анализ уровня чувствительности проводился с использованием уже описанных ранее антибиотиков, Рисунок 4.12.

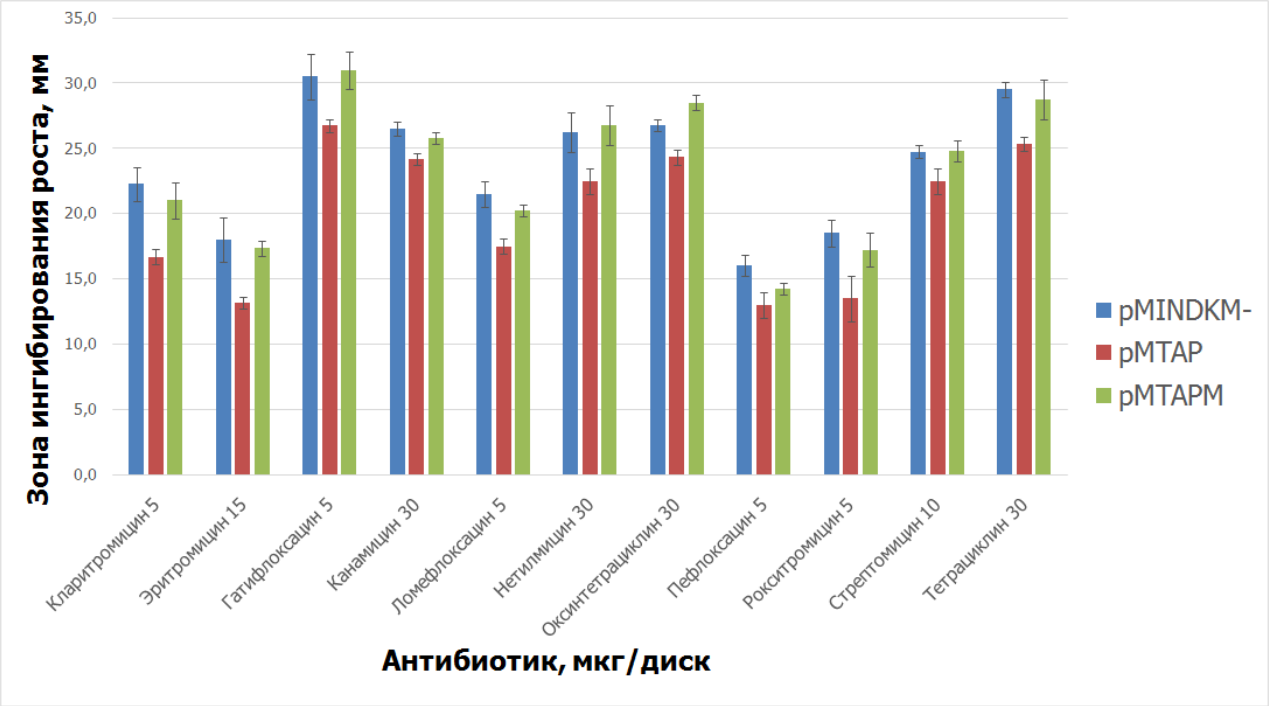


Рисунок 4.12. Зоны ингибирования роста трансформантов *M. smegmatis*. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Сравнительный анализ уровня лекарственной устойчивости клеток трансформантов показал, что Tap обеспечивает лекарственную устойчивость (предположительно, активный транспорт антибиотиков во внеклеточное пространство) к аминогликозидам (стрептомицин, канамицин, нетилмицин) и тетрациклинам (окситетрациклин, тетрациклин). Однако, помимо раннее описанного фенотипа устойчивости показано участие гена *tap* в обеспечении устойчивости к антибиотикам класса фторхинолонов (гатифлоксацин, ломефлоксацин, пефлоксацин) и макролидов (кларитромицин, рокситромицин, эритромицин). Уровень лекарственной устойчивости культуры, содержащей *tap*(insC_{581}), соответствует уровню культуры, содержащей вектор без вставки, что показывает отсутствие активности транспортера при экспрессии *tap*(insC_{581}). Для других антибиотиков статистически значимых различий в уровне лекарственной чувствительности не обнаружено.

4.2.4. Влияние сверхэкспрессии гена *Rv1473* на уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis*

Анализ изменения зон ингибирования роста культур при воздействии антибиотиков на клетки трансформантов *M. smegmatis*, содержащих дополнительную копию гена *Rv1473* приведен на Рисунке 4.13.

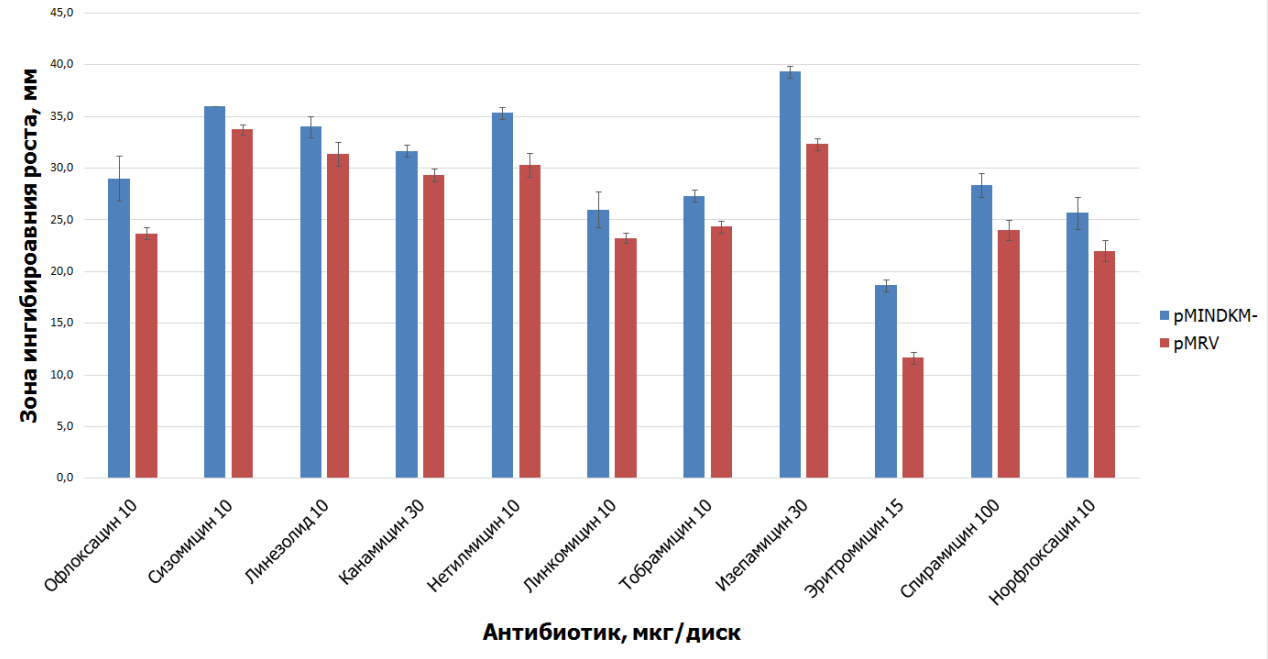


Рисунок 4.13. Зоны ингибирования роста трансформантов *M. smegmatis*. Планки погрешности – стандартное отклонение.

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 (офлоксацин, спарфлоксацин, норфлоксацин), аминогликозидам (сизомицин, канамицин, нетилмицин, тобрамицин, изепамицин), макролидам (эритромицин, спирамицин), а также к азалидам (линкозамиду) и линкомицину – синтетическому антибиотику. Статичтически значимых различий в уровне лекарственной чувствительности между аллельными вариантами гена *Rv1473* обнаружено не было. Для других антибиотиков статистически значимых различий в уровне лекарственной чувствительности не обнаружено.

4.2.5. Определение МИК антибиотиков для трансформантов *M. smegmatis*

Определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков: хлорамфеникола, кларитромицина, стрептомицина, офлоксацина и тетрациклина, в жидкой среде. Данные антибиотики были использованы для уточнения уровня лекарственной устойчивости и как базовые для различных химических классов: хлорамфеникол – фениколы, кларитромицин – макролиды, стрептомицин – аминогликозиды, офлоксацин – фторхинолоны и тетрациклин как представитель группы тетрациклинов. Результаты определения МИК представлены в Таблице 4.10.

Таблица 4.10. Определение МИК клеток трансформантов *M. smegmatis*

Трансформант	Cm, мкг/мл	CL, мкг/мл	SM, мкг/мл	OFX, мкг/мл	TET, мкг/мл
pMINDKM-	32	0.25	0.125	0.5	0.0625
pMWB7	**64**	**0.5**	н/о	н/о	**0.125**
pMWB7M	32	0.25	н/о	н/о	0.0625
pMTAP	н/о	**0.5**	**0.25**	0.5	н/о
pMTAPM	н/о	0.25	0.125	0.5	н/о

Жирным шрифтом отмечены отклоняющиеся значения; н/о – МИК не определялся.

В результате определения изменения МИК было установлено, что ген *whiB7* при его сверхэкспрессии обусловливает высокий уровень лекарственной устойчивости к хлорамфениколу (увеличение МИК в 2 раза), кларитромицину и тетрациклину. Сверхэкспрессия гена *tap* также обеспечивает увеличение лекарственной устойчивости к кларитромицину и стрептомицину (Увеличение МИК в 2 раза).

При проведении аналогичного исследования с использованием дополнительной копии гена *Rv1473* и его мутантного варианта не было

выявлено ни одного случая изменения уровня лекарственной устойчивости, что может говорить о том, что транспорт антибиотиков является для данного транспортёра «побочной» функцией или не осуществляется.

Исходя из полученных данных, можно составить схему лекарственной устойчивости опосредованную транскрипционным фактором WhiB7, Рисунок 4.14.

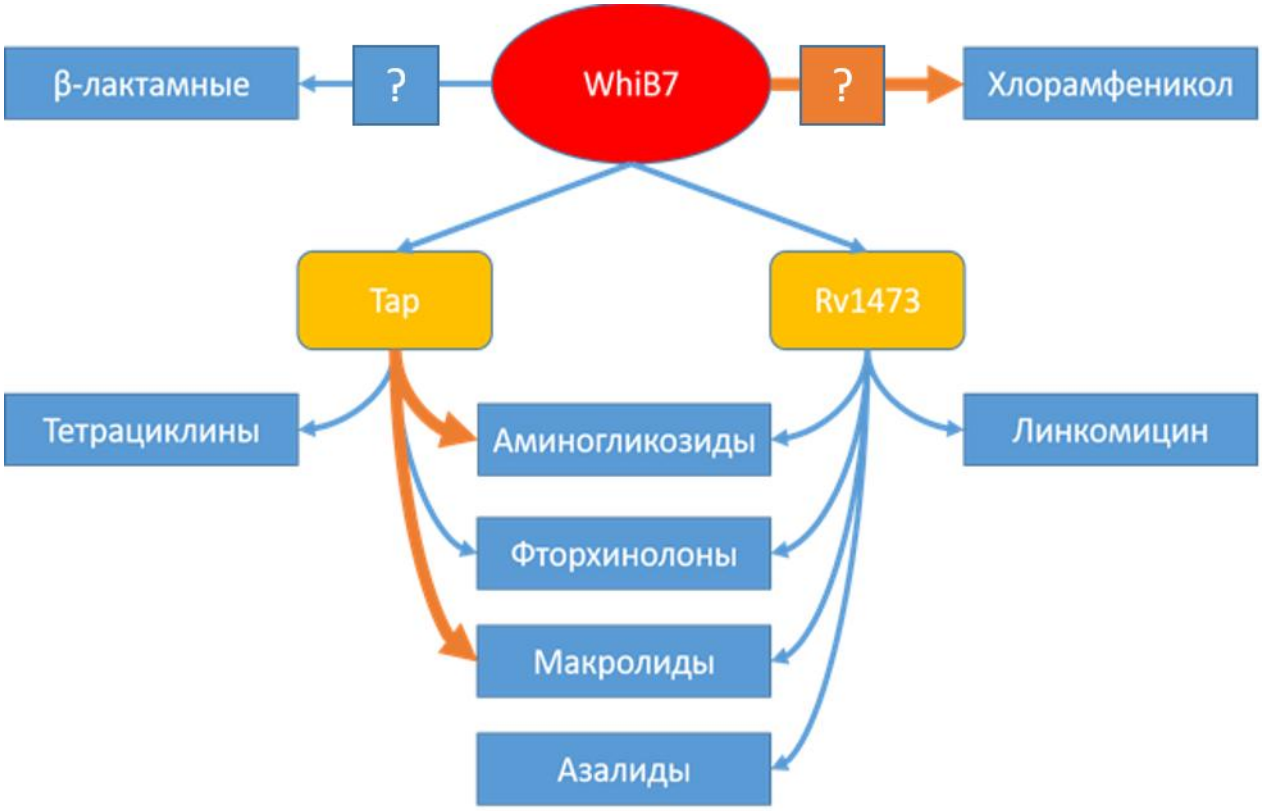


Рисунок 4.14. Схема лекарственной устойчивости, определяемая генами регулона WhiB7. Стрелками показана устойчивость, определяемая продуктами генов WhiB7 регулона. Оранжевые стрелки – высокий уровень лекарственной устойчивости, детектированной методом определения МИК. ? – неисследованные гены регулона WhiB7.

Таким образом, природная лекарственная устойчивость, определяемая генами WhiB7 регулона, является разносторонней и, возможно, перекрестной, то есть может возникать в ответ на воздействия антибиотиком на экспрессию WhiB7 и далее индуцировать экспрессию генов регулона. Тем самым, данная

система является жизненно важной и позволяет *M. tuberculosis* адаптироваться к условиям стресса, возникающего под действием антибиотиков.

Исходя из полученной схемы действия WhiB7, интерес представляет исследование возможного возникновения перекрестной лекарственной устойчивости, определения места регулона WhiB7 в данном клеточном ответе, а также поиск потенциальной связи между экспрессией гена *whiB7* и другими, новыми генами кандидатами, потенциально участвующими в обеспечении природной лекарственной устойчивости.

4.2.6. Заключение к разделу 4.2.

Исследование влияния, отобранных аллельных вариантов генов регулона WhiB7 (*whiB*7ΔG191, *tap*(insC581), *Rv1473*(C422T)), позволило расширить знание о спектре лекарственной устойчивости, определяемой продуктами данных генов. Так, было установлено, что помимо регуляции лекарственной устойчивости к аминогликозидным, макролидным, антибиотикам группы тетрациклинов и фениколам, WhiB7 регулирует экспрессию генов осуществляющих лекарственную устойчивость к β-лактамным антибиотикам.

Клеточный транспортер Tap, обусловливает лекарственную устойчивость к антибиотикам групп аминогликозидов, тетрациклинов, фторхинолонов и макролидов. Сверхэкспрессия гена *Rv1473*, кодирующего клеточный транспортер, увеличивает уровень лекарственной устойчивости *M. smegmatis* к фторхинолонам, аминогликозидам, макролидам, а также к азалидам и линкомицину – синтетическому антибиотику. Уровень лекарственной устойчивости был проверен методом поиска минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков, с использованием контрольных антибиотиков.

4.3. Исследование явления перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155

Полученные результаты показали, что WhiB7 как транскрипционный фактор, способен регулировать лекарственную устойчивость у *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. Описанная ранее схема устойчивости к антибиотикам, определяемая WhiB7 (Рисунок 4.14), является классической схемой перекрестной лекарственной устойчивости. Основываясь на этом факте, а также на данных определения лекарственной чувствительности полученных нами трансформантов *M. smegmatis*, было проведено исследование явления перекрёстной лекарственной устойчивости клеток *M. smegmatis* и проведен транскрипционный анализ генов, потенциально вовлеченных в реализацию перекрестной устойчивости.

4.3.1. Принципы и методика изучения индукции перекрестной лекарственной устойчивости к антибиотикам у *M. smegmatis*

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, канамицин, эритромицин, офлоксацин и тетрациклин. Данные антибиотики относятся к различным химическим классам веществ, используемых для антимикробной, в том числе противотуберкулезной терапии и являются базовыми в своих химических классах. В Таблице 4.11, приведены подобранные концентрации используемых антибиотиков:

Таблица 4.11. Концентрации антибиотиков, использованные в эксперименте по индукции перекрестной лекарственной устойчивости

Класс антибиотика	Антибиотик	Концентрация антибиотика мкг/мл
Аминогликозиды	Канамицин	**0,03**
	Стрептомицин	**0,02**
Фторхинолоны	Офлоксацин	**0,2**
Тетрациклины	Тетрациклин	**0,02**
Макролиды	Эритромицин	**0,2**

4.3.1.1 Оценка уровня индукции перекрестной лекарственной устойчивости, осуществляемой канамицином

Антибиотики, в подобранных концентрациях, приведенных в Таблице 4.8, были использованы для индукции природной перекрестной лекарственной устойчивости.

Уровень чувствительности к 33 антибиотикам (см. Приложение А, Таблица 1) определяли методом бумажных дисков, в качестве контроля использовали культуру, выращиваемую в среде без добавления антибиотиков. На Рисунке 4.15 представлены результаты значимых изменений уровня лекарственной чувствительности клеток *M. smegmatis* mc^2 155, после воздействия на них канамицином.

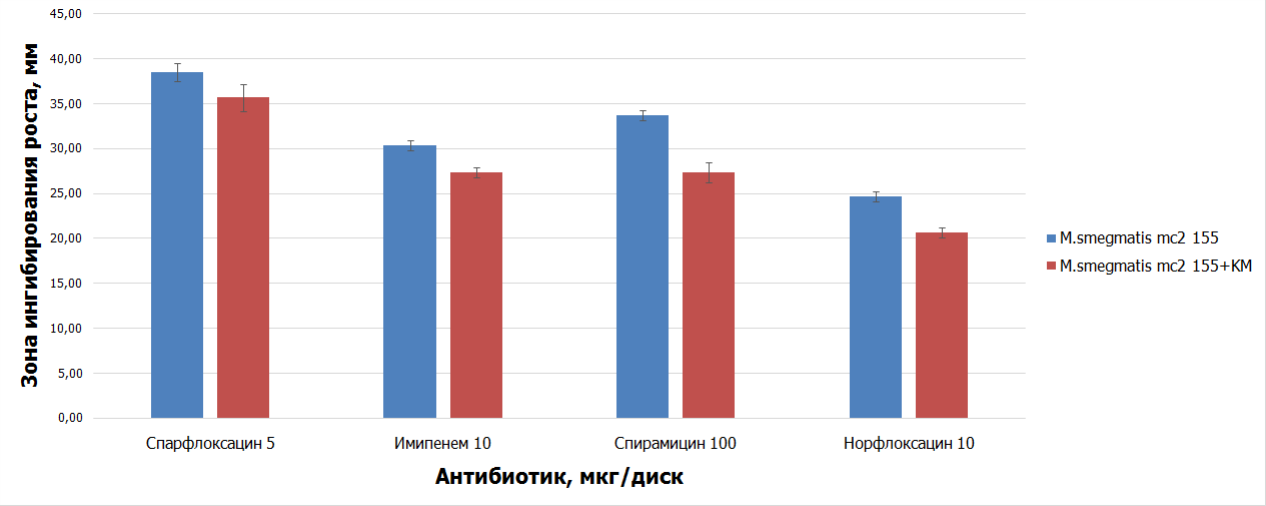


Рисунок 4.15. Оценка уровня чувствительности *M. smegmatis*, при воздействии канамицином. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Как следует из данных, представленных на рисунке 4.17, под действием на культуру клеток *M. smegmatis* mc^2 155 канамицина, достоверно снижался диаметр зон ингибирования роста культуры *M. smegmatis* вокруг дисков с спарфлоксацином и норфлоксацином, имипенемом, а также с спирамицином.

Таким образом, канамицин достоверно индуцирует устойчивость культуры *M. smegmatis* к вышеперечисленным антибиотикам. Для других исследуемых антибиотиков, значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

4.3.1.2 Оценка уровня перекрестной лекарственной устойчивости, осуществляемой стрептомицином

На Рисунке 4.16 представлено изменение уровня лекарственной чувствительности клеток *M. smegmatis* mc^2 155, после воздействия на них стрептомицином.

Рисунок 4.16. Оценка уровня чувствительности *M. smegmatis*, при воздействии стрептомицином. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Данные, представленные на Рисунке 4.18, демонстрируют, что под действием на клетки *M. smegmatis* mc^2 155 стрептомицина, уменьшался диаметр зон ингибирования роста культуры вокруг дисков с рифампицином.

Таким образом, стрептомицин является достоверным индуктором лекарственной устойчивости культуры *M. smegmatis* mc^2 155 к рифампицину. Для других исследуемых антибиотиков, значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

4.3.1.3 Оценка уровня индукции перекрестной лекарственной устойчивости офлоксацином

На Рисунке 4.17 представлено изменение уровня лекарственной чувствительности клеток *M. smegmatis* mc^2 155, после воздействия на них офлоксацином.

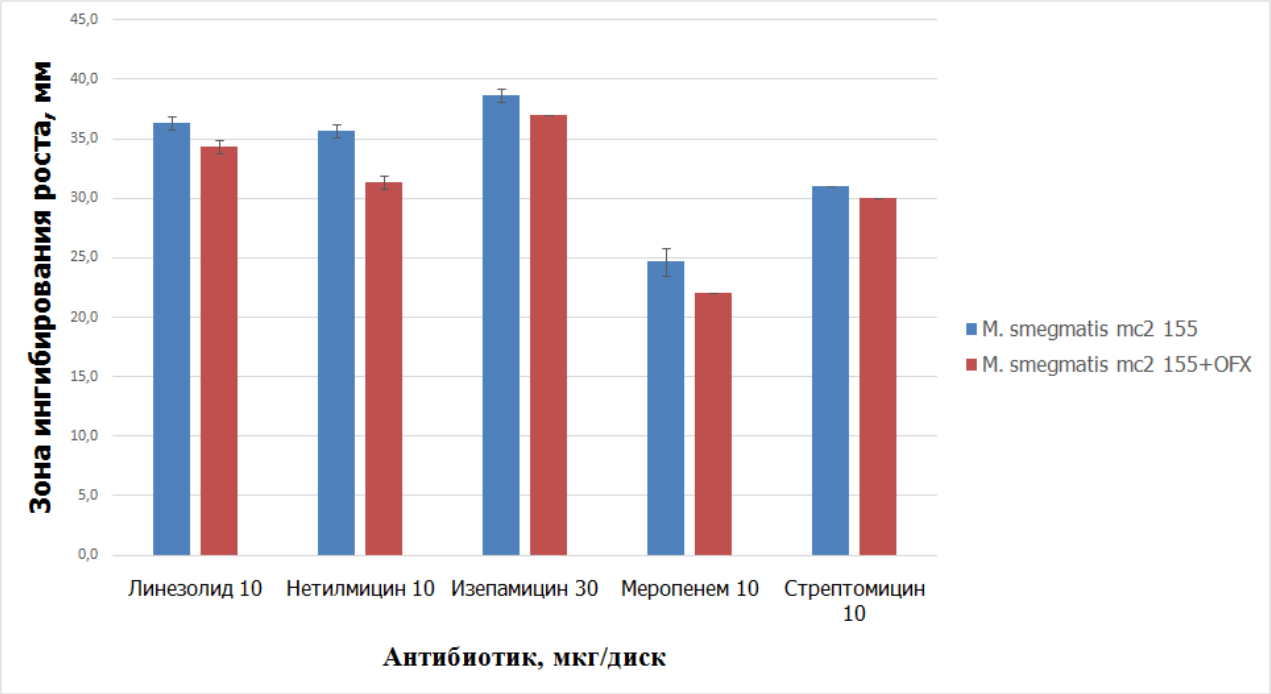


Рисунок 4.17. Оценка уровня чувствительности культуры *M. smegmatis*, при воздействии офлоксацином. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Анализируя полученные данные, воздействие на *M. smegmatis* офлоксацином приводит к повышению лекарственной устойчивости культуры *M. smegmatis* mc^2 155 к аминогликозидным антибиотикам: нетилмицину, изепамицину и стрептомицину, β-лактамному меропенему и антибиотику группы азалиды - линезолиду. Для других исследуемых антибиотиков, значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

Таким образом, офлоксацин является достоверным индуктором лекарственной устойчивости к β-лактамному антибиотику, азалиду и аминогликозидам. Для других исследуемых антибиотиков, значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

4.3.1.4 Оценка уровня индукции перекрестной лекарственной устойчивости, осуществляемой эритромицином

Помимо возникновения перекрестной лекарственной устойчивости, добавление антибиотика-индуктора приводило к возникновению лекарственной устойчивости к антибиотикам класса индуктора эритромицина (макролида), Рисунок 4.18.

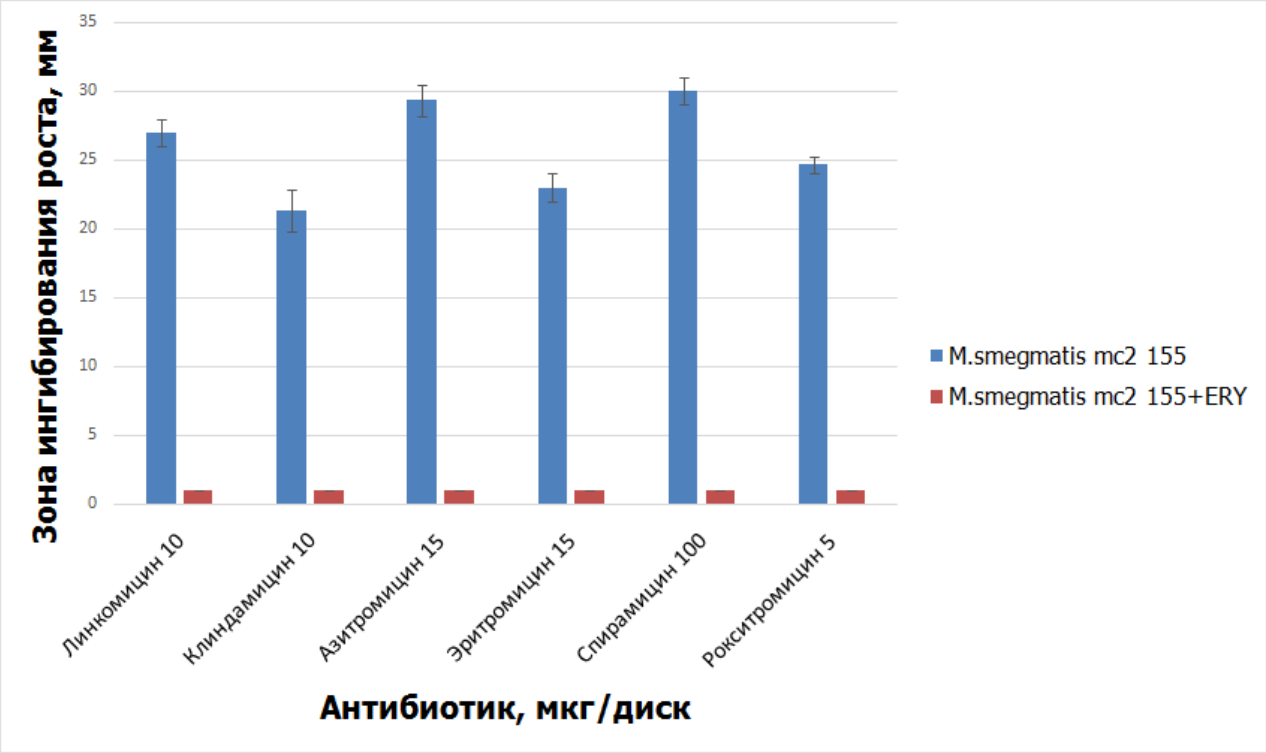


Рисунок 4.18. Оценка уровня чувствительности клеток *M. smegmatis*, при воздействии эритромицином. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Данные предоставленные на Рисунке 4.18, свидетельствуют о том, что воздействие на клетки *M. smegmatis* офлоксацином приводит к достоверному повышению лекарственной устойчивости культуры к макролидным антибиотикам. Для других исследуемых антибиотиков, значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

4.3.1.5 Оценка уровня индукции перекрестной лекарственной устойчивости, осуществляемой тетрациклином

На Рисунке 4.19 представлено изменение уровня лекарственной устойчивости клеток *M. smegmatis* mc^2 155, после воздействия на них тетрациклином.

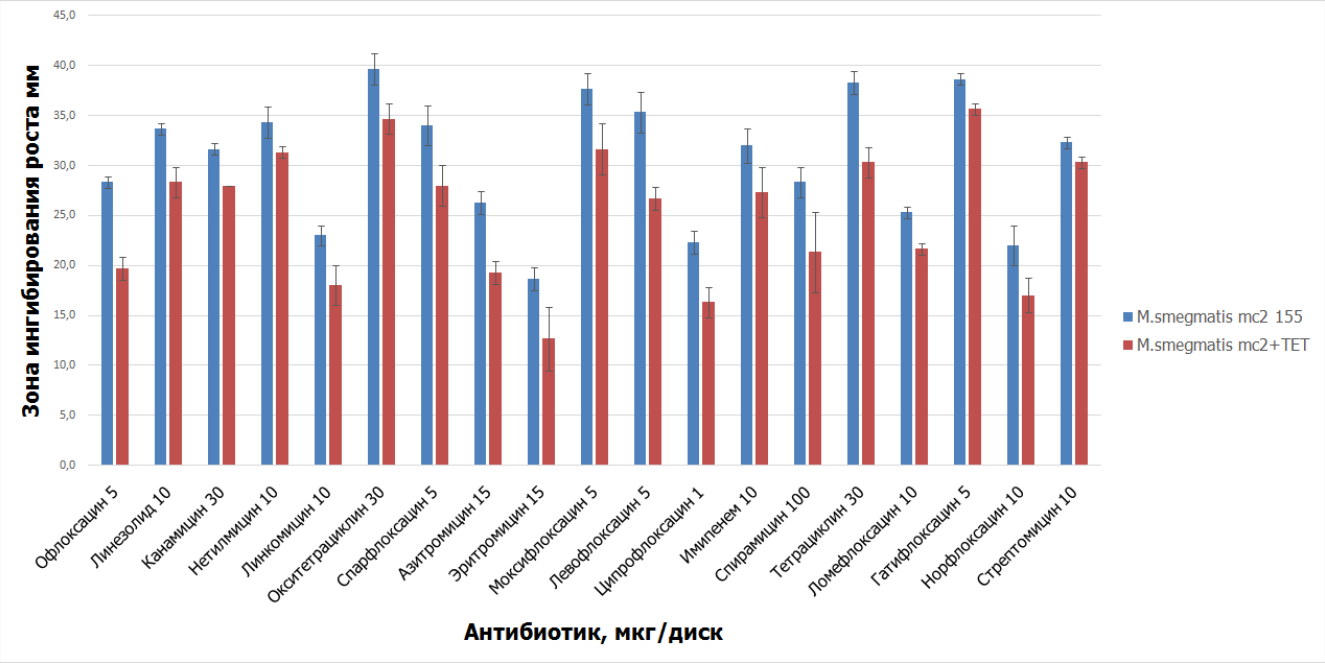


Рисунок 4.19. Оценка уровня чувствительности клеток *M. smegmatis*, при воздействии тетрациклином. Планки погрешности – стандартное отклонение.

При воздействии на культуру клеток *M. smegmatis* индуктором – тетрациклином, наблюдался рост уровня лекарственной устойчивости культуры практически ко всем классам антибиотиков: фторхинолонам, азалидам, макролидам, аминогликозидам, β-лактамным и тетрациклинам. Таким образом, исходя из наших результатов, тетрациклин достоверно является мощным индуктором неспецифической перекрестной лекарственной устойчивости. Для других исследуемых антибиотиков, значимых изменений зон ингибирования роста не обнаружено.

Таким образом, антибиотики класса аминогликозидов, фторхинолонов и тетрациклинов приводят к развитию перекрестной лекарственной

устойчивости культуры *M. smegmatis*. Для других исследуемых антибиотиков, перекрестной лекарственной устойчивости не обнаружено.

4.3.1.6 Оценка уровня повышения лекарственной чувствительности, вызываемой низкими концентрациями антибиотиков

Помимо повышения уровня лекарственной устойчивости, добавление низкой концентрации антибиотиков в культуральную среду приводило к снижению уровня устойчивости *M. smegmatis*. На Рисунке 4.20 представлена оценка уровня лекарственной чувствительности возникающей под действием антибиотиков различных классов.

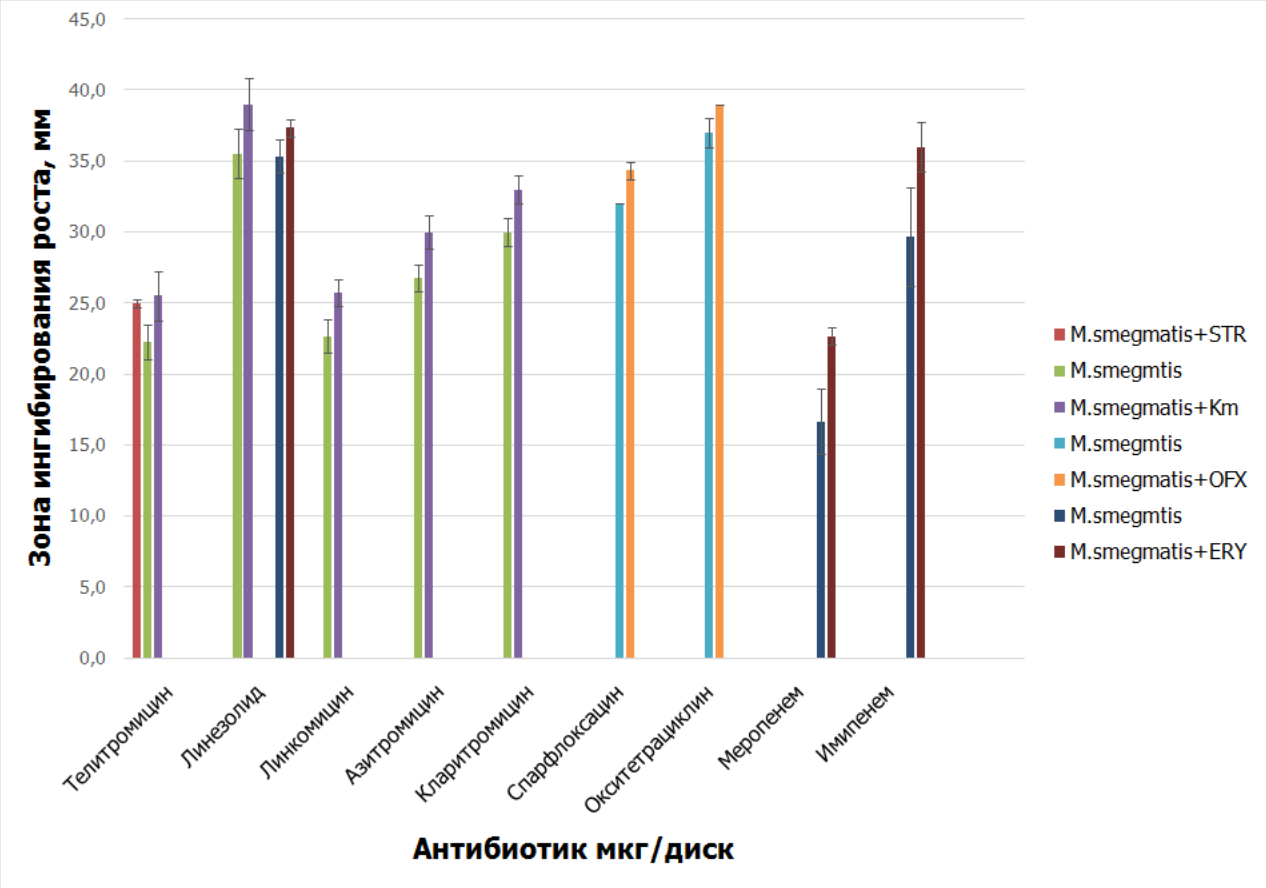


Рисунок 4.20. Оценка уровня чувствительности клеток *M. smegmatis*, под действием антибиотиков в низких концентрациях. Планки погрешности – стандартное отклонение.

Анализ представленных данных показал: добавление в клеточную культуру *M. smegmatis* аминогликозида - стрептомицина повышает чувствительность к макролидному антибиотику – телитромицину, а канамицина к линкомицину (линкозамиды), азалиду – линезолиду и макролидам: азитромицину и кларитромицину. Офлоксацин, антибиотик группы фторхинолонов, повышает чувствительность к члену собственного класса – спарфлоксацину, а также к антибиотику группы тетрациклинов – окситетрациклину. Макролид, эритромицин, повышает чувствительность к антибиотикам группы β-лактамов (меропенем и имипенем), а также к азалиду – линезолиду.

Наиболее значимые результаты, применимые к *M. tuberculosis*, получены при исследовании влияния канамицина и эритромицина на повышение лекарственной чувствительности к линкозамидам, азалидам и макролидам. При добавлении эритромицина, наблюдается повышение лекарственной чувствительности к β-лактамам и азалидам.

Данные о повышении лекарственной чувствительности *M. smegmatis*, позволяют нам высказать предположение о том, что антибиотики, в низких концентрациях (не влияющих на рост бактериальной культуры) могут обладать качеством адъювантов и, потенциально, сформировать III класс адъювантов антибиотиков (см. Раздел 2.4).

4.3.2. 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 [Bowman et al., 2014], был проведен поиск генов, потенциально вовлеченных в осуществление перекрёстной лекарственной устойчивости и антибиотикотолерантности у *M. smegmatis*. Отбор генов *M. smegmatis* для

проведения транскрипционного анализа проводился с использованием существующей информации о функции продуктов генов и степенью их изученности, а также наличия ортологичных генов в системе *M. tuberculosis*.

В качестве генов-кандидатов, потенциально участвующих в реализации транскрипционного ответа на воздействие антибиотиков, были отобраны глобальные регуляторы устойчивости, а также потенциально новые гены, возможно участвующие в транскрипционном ответе на лекарственный стресс, Таблица 4.12.

Помимо исследования участия транскрипционных факторов в процессах возникновения перекрестной лекарственной устойчивости, в настоящей работе, также исследовался механизм толерантности к антибиотикам. Данный механизм опосредован протеазо-зависимой саморегулирующейся экспрессией генов системы ТА [Page et al., 2016].

В геноме *M. smegmatis* обнаружено всего 3 системы ТА II типа (См. Раздел 2.3.5), состоящих из трех пар ТА: *vapBC*, *mazEF*, *phd/doc* [Frampton et al., 2012]. Данные системы ТА характеризуются схожей организацией, Рисунок 4.21, и механизмом действия. Для анализа были выбраны все три известные системы, а также неизученный, четвертый член семейства ТА II типа – VapBC2 (*MSMEG_6760-MSMEG_6762*), Таблица 4.12, [Bajaj et al., 2016]. Пара *MSMEG_6760-MSMEG_6762*, является вторым представителем семейства VapBC у *M. smegmatis* с математически предсказанной функцией и составленной, методом X-ray кристаллографии 3D моделью. Интересен тот факт, что помимо свойственного системам VapBC, PIN-домена и РНКазной активности, MSMEG_6760 имеет аминокислотную последовательность, функция которой не известна [Bajaj et al., 2016].

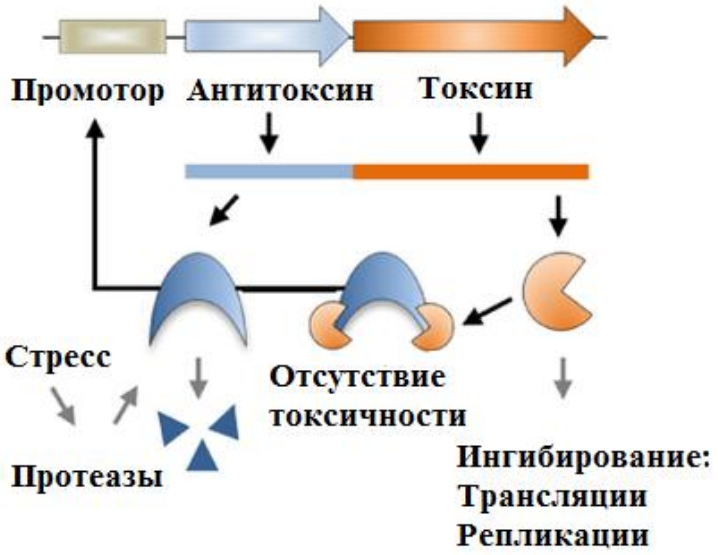


Рисунок 4.21. Система организации и работы системы ТА II типа [Page et al., 2016].

Гены и системы генов, отобранные для дальнейшего анализа их роли в индукции перекрестной лекарственной устойчивости, представлены в Таблице 4.12.

Таблица 4.12. Гены транскрипционных факторов и систем ТА, предположительно участвующие в лекарственной устойчивости и толерантности к антибиотикам

Ген	Функция	Фенотип устойчивости, механизм действия	Литературная ссылка
whiB7	Транскрипционный фактор	Аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, фторхинолоны, хлорамфеникол, β-лактамы	[Morris et al., 2005]
napM	Транскрипционный фактор	Рифампицин, этамбутол	[Liu et al., 2016b]
ltmA	ц-ди-ГМФ-зависимый транскрипционный фактор	Рифампицин, изониазид	[Li et al., 2012]
tetR	Транскрипционный фактор	Рифампицин	[Liu et al., 2016a]

rbpA	Транскрипционный фактор	Рифампицин	[Hu et al., 2012]
mtrA	Транскрипционный фактор	Изониазид, стрептомицин, рифампицин Б	[Li et al., 2010]
mfpB	регуляция ДНК-гиразы	Фторхинолоны	[Tao et al., 2013]
lfrR	Транскрипционный фактор	Фторхинолоны	[Sander et al., 2000]
marR	Транскрипционный фактор	Изониазид, рифампицин, этамбутол, канамицин	[Bowman et al., 2014]
araC	Транскрипционный фактор	Рифампицин, канамицин, хлорамфеникол	[Evangelopoulos et al., 2014]
blaS	β-лактамаза	β-лактамы	[Flores et al., 2005]
mazEF	Токсин-антитоксин	Толерантность к антибиотикам	[Frampton et al., 2012]
phd/doc	Токсин-антитоксин	Толерантность к антибиотикам	[Liu et al., 2008]
vapBC30	Токсин-антитоксин	Толерантность к антибиотикам	[Ahidjo et al., 2011; Robson et al., 2009]
vapBC2	Токсин-антитоксин	Толерантность к антибиотикам	[Bajaj et al., 2016]

Индукторы для дальнейшего исследования были отобраны на основе результатов, полученных при анализе изменения лекарственной чувствительности с использованием дисков. Исходя из того, что тетрациклин специфично индуцирует экспрессию многочисленных транскрипционных регуляторов TetR [Blokpoel et al., 2005], осуществляющих специфичную природную лекарственной устойчивость к широкому спектру антибиотиков, тетрациклин был исключен, как индуктор, из дальнейшего анализа.

Для оценки участия этих генов в перекрестной лекарственной устойчивости, был проведен их транскрипционный анализ в условиях индукции стрептомицином, офлоксацином и канамицином в низких концентрациях (Таблица 4.11).

4.3.3. Исследование экспрессии генов природной перекрестной лекарственной устойчивости и толерантности *M. smegmatis*

Анализ относительного, нормализованного уровня экспрессии генов, отобранных в результате анализа литературных источников, (см. Раздел 4.3.2) при добавлении индуктора, представлен на Рисунке 4.22.

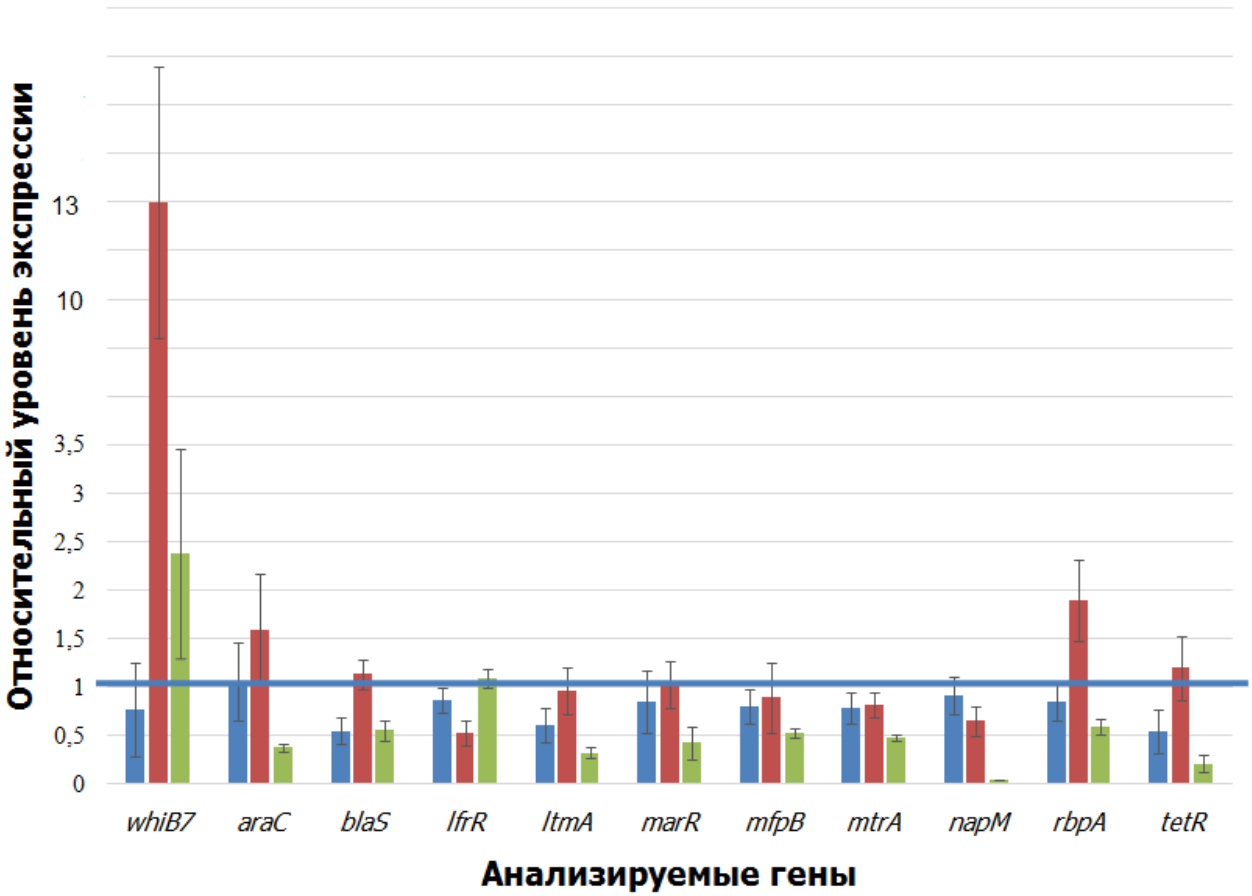


Рисунок 4.22. Относительный уровень экспрессии генов-кандидатов при культивировании бактерий в среде, содержащей антибиотики: синий столбик – стрептомицин, красный – канамицин, зеленый - офлоксацин. Относительный уровень экспрессии нормализован на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства *sigA* и *polA*. Экспрессию генов в условиях отсутствия антибиотиков считали равной 1.

Результат транскрипционного анализа генов ТА, ответственных за толерантность к антибиотикам, показан на Рисунке 4.23.

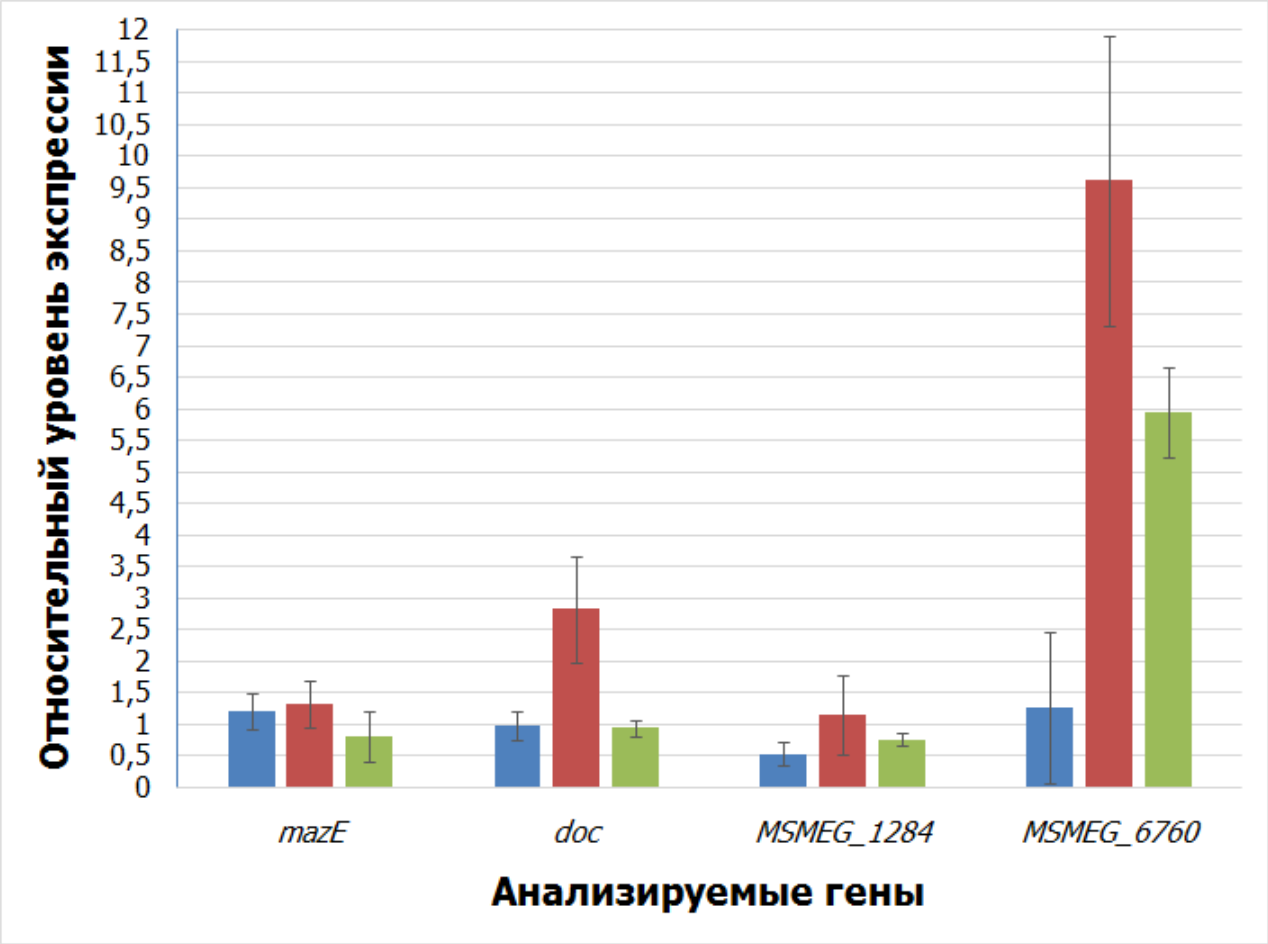


Рисунок 4.23. Относительный уровень экспрессии генов системы ТА бактерий, выращенных в присутствии антибиотиков. Синий столбик – в присутствии стрептомицина, красный – канамицина, зеленый – офлоксацина. Относительный уровень экспрессии нормализован на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства *sigA* и *polA*.

Для обобщения и систематизации полученных результатов, были отобраны гены, чья экспрессия изменялась более чем в 2 раза. Такое изменение в уровне экспрессии считалось значимым и пригодным для дальнейшего анализа влияния отобранных генов в реализации природной перекрестной лекарственной устойчивости, Таблица 4.13.

Таблица 4.13. Изменение уровня экспрессии исследуемых генов и систем генов под действием низких концентраций антибиотиков

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

*- изменение уровня экспрессии относительно 1 (уровня экспрессии исследуемых генов у *M. smegmatis* без антибиотика);
**- При воздействии стрептомицина, значимых изменений в уровне транскрипции выявлено не было.

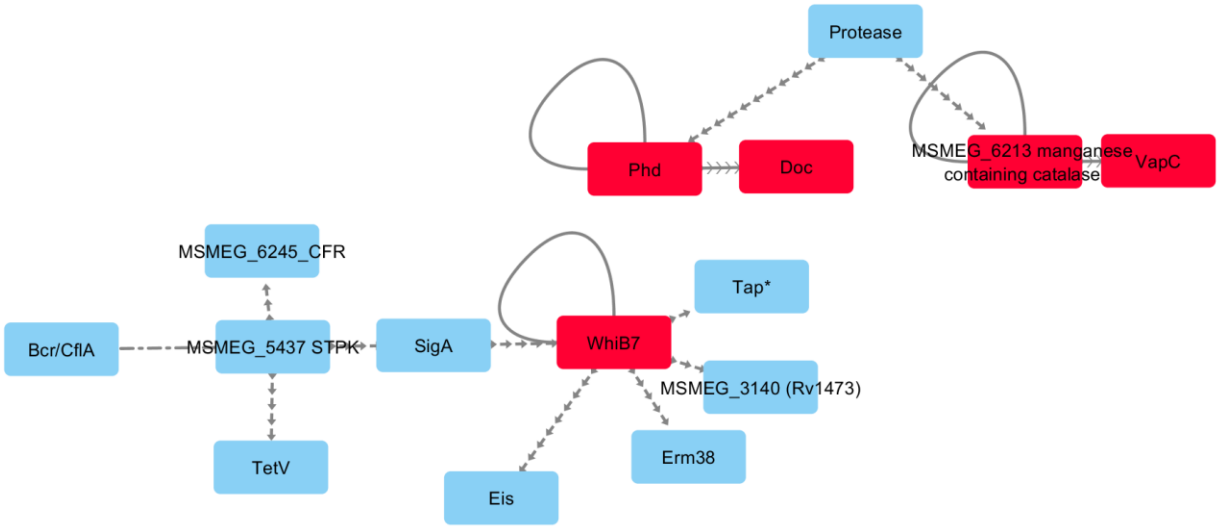
Таким образом, канамицин является индуктором экспрессии гена *whiB7* (в 13,2 раз), модуля ТА *phd/doc* в (2,8 раз), а также модуля ТА - *vapBC2* в 9,6 раз. Офлоксацин индуцирует экспрессию гена *whiB7* в 2,37 раза и модуля ТА - *vapBC2* в 6 раз.

В отличие от канамицина и тем более стрептомицина, офлоксацин, в основном, приводил к снижению уровня экспрессии исследуемых генов: *araC* в 2,7 раза; *ltmA* в 3,1 раза; *marR* 2,3 раза; *mtrA* в 2 раза; *napM* в 27, *tetR* в 5 раз.

4.3.3.1 Построение генетических сетей перекрестной лекарственной устойчивости

Для понимания механизмов индукции лекарственной устойчивости и ответа на стресс, вызванный антибиотиками, составлена предполагаемая схема генетического контроля, связывающая отобранные транскрипционные факторы и подконтрольные им гены.

На Рисунке 4.24 представлена генетическая сеть, состоящая из отобранных транскрипционных факторов и генов ТА, индукция которых изменялась под действием канамицина в качестве индуктора.



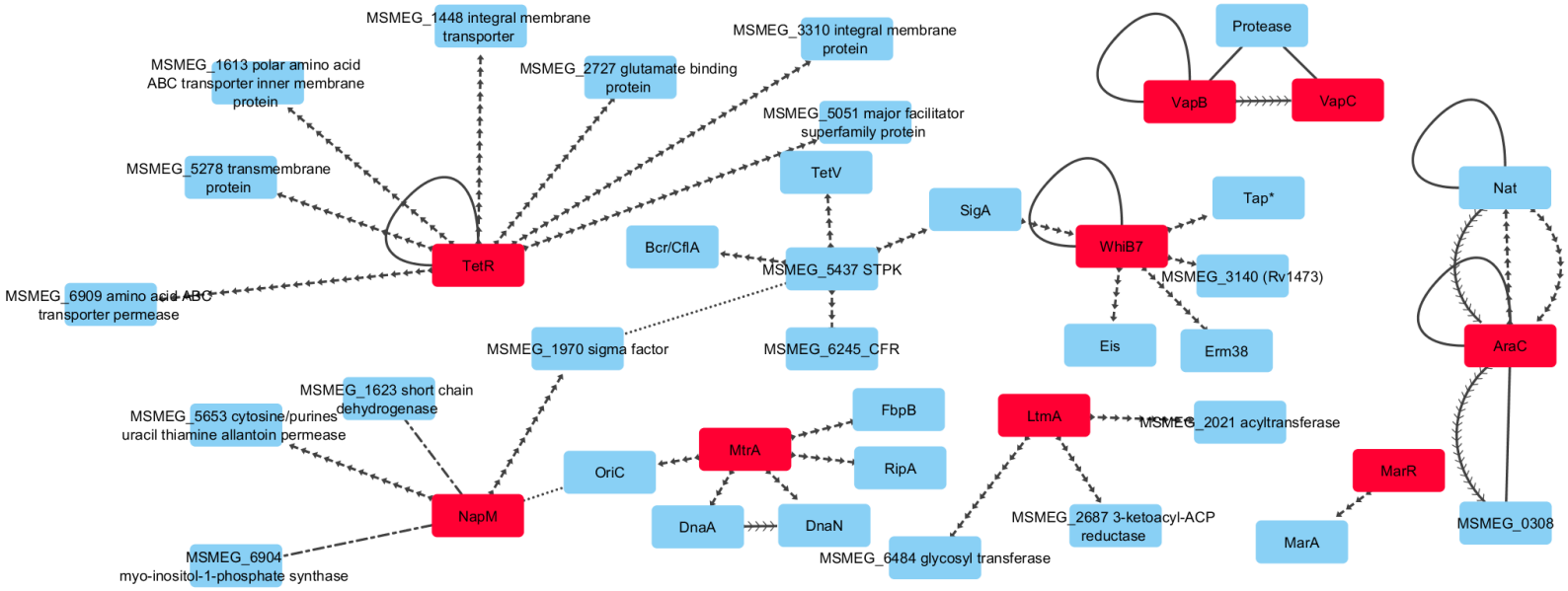
*-псевдоген [Morris et al., 2005]

Рисунок 4.24. Предполагаемая схема генетического контроля перекрестной лекарственной устойчивости при воздействии канамицином на *M. smegmatis*. Красным выделены исследованные, на транскрипционном уровне, гены, Синим – подконтрольные им гены (Таблица 4.10). Стрелками показаны взаимодействия продуктов генов с ДНК генов, штрихпунктиром – негативная регуляция экспрессии гена *bcr*. Линии со стрелками – оперонная организация генов; петлями обозначена саморегуляция экспрессии.

Канамицин является антибиотиком, обладающим более выраженным эффектом, чем его ближайший родственник – стрептомицин. Таким образом, по сравнению со стрептомицином, наблюдался более выраженный клеточный ответ на действие антибиотика на клетки *M. smegmatis*. Предположительно, протеинкиназа MSMEG_5437, в ответ на присутствие канамицина в клетке, индуцирует, через фосфорилирование анти-сигма фактора, экспрессию гена *whiB7* (см. Раздел 2.3.8). 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 [Bowman et al., 2014], Рисунок 4.24.

Другой группой исследуемых генов были гены системы токсин-антитоксин II типа - *phd/doc* и *vapBC2*. Экспрессия, данных ТА модулей зависит от присутствия специфичных протеаз, активных в отношении антитоксинов [Page et al., 2016]. Соответственно, усиление транскрипции модуля ТА свидетельствует об отсутствии протеаз, снижения расщепления антитоксинов и усиления экспрессии ТА модулей *phd/doc* и *vapBC2* за счет накопления собственных антитоксинов (саморегуляция экспрессии). Таким образом, канамицин не переводит клетки в дормантное состояние.

Другим механизмом действия обладает исследуемый антибиотик – офлоксацин. Как было описано выше (См. Раздел 2.2.3), мишенью действия фторхинолонов является ДНК-гираза. Суммируя данные, полученные с помощью анализа уровня транскрипции, нами была составлена предполагаемая схема, Рисунок 4.25, участия исследуемых генов в реализации перекрестной лекарственной устойчивости, вызываемой фторхинолонами.



*-псевдоген

Рисунок 4.25. 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 (Таблица 4.10). Стрелками показаны генные взаимодействия, штрихпунктиром – негативная регуляция экспрессии гена *bcr* и *MSMEG_6904*, пунктиром – слабые взаимодействия. Линии со стрелками – оперонная организация генов; петлями обозначена саморегуляция экспрессии.

Как видно из результатов транскрипционного анализа происходило увеличение уровня экспрессии гена *whiB7* и генов ТА модуля *vapBC2*, и снижение уровня экспрессии остальных генов. Как и в случае стресса, вызываемого канамицином, наблюдалась индукция экспрессии генов регулона WhiB7 и генов системы ТА. Видимо, имеет место аналогичная индукция с привлечением киназы *MSMEG_5437* (см. Рисунок 4.24 и Рисунок 4.25).

Однако, происходит значительное, в 27 раз, снижение экспрессии гена нуклеотид-ассоциированного белка NapM. Данный белок неспецифично связывается с A/T богатыми участками ДНК, в частности с *oriC*, а также предотвращает нарушение структуры ДНК, ферментом ДНКазой I. Помимо неспецифичной регуляции репликации, NapM, регулирует, разнонаправленно, экспрессию ряда генов, участвующих в реализации лекарственной устойчивости *M. smegmatis* к антибиотикам [Liu et al., 2016b]. Таким образом, при снижении количества транскриптов гена *napM*, в случае негативной регуляции, помимо активации транскрипции клеточных транспортеров (снятие репрессии), происходит активация транскрипции иных генов, вовлеченных в процессах природной лекарственной устойчивости к фторхинолонам.

Другим объяснением снижения экспрессии гена, может служить свойство белка NapM неспецифично связываться с A/T богатыми областями ДНК. При воздействии офлоксацина, нами был фиксирован резкий спад уровня транскрипции гена *napM* и предположительно снижение титра белка в клетке *M. smegmatis*. Аналогично со снижением транскрипции гена *napM*, по литературным данным, известно о снижении экспрессии генов, чьи продукты участвуют в репликации ДНК: *gyrAB* (ДНК-гираза), *topA* (топоизомераза I) у штамма, нокаутного по гену *napM* [Walter et al., 2015]. 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 у бактерий.

Отдельно стоит рассмотреть изменение уровня экспрессии генов антибиотикотолерантности – *vapBC2*. 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 ТА модулей *M. smegmatis*, в 9,5 раз против 2,5 у *phd/doc* при индукции канамицином и в 6 раз при воздействии офлоксацином. Уровень экспрессии других трех ТА модулей, при воздействии офлоксацином на *M. smegmatis* не изменялся. Таким образом, VapBC2, возможно является ключевым модулем ТА II типа, в осуществлении антибиотикотолерантности у *M. smegmatis*.

Данный модуль ТА имеет в своем составе PIN-домен, характерный для VapBC, а также обладает РНКазной активностью, при низкой гомологии по всей длине как аминокислотной последовательности токсина, так и антитоксина. Также показана его гомология с Hsp90 АТФазой эукариот. Функция данных ферментов заключается в повышении эффективности фолдинга белков эукариот в условиях стресса. Хотя в составе генома *M. smegmatis* и отсутствует гомолог Hsp90 [Panaretou et al., 2002], недавно было обнаружено, что белок DnaK/Hsp70 является основным шаперонным белком микобактерий, который ограничивает фолдинг белка в условиях стресса [Fay et al., 2014]. Возможно функция данного токсина напрямую связана с фолдингом белка у микобактерий и останавливает рост клеток в условиях стресса.

Обобщая полученные результаты можно сказать о том, что имеет место развитие перекрестной лекарственной устойчивости под действием аминогликозидных антибиотиков и антибиотиков группы фторхинолонов. Возможно, ключевыми генами, отвечающими за клеточный ответ являются гены глобального регулятора транскрипции WhiB7 и протеинкиназы *MSMEG_5437*. WhiB7, непосредственно осуществляет перекрестную лекарственную устойчивость у микобактерий. Таким образом, частично, был определен пул генов, ответственных за индукцию лекарственной устойчивости

в условиях стресса антибиотиками двух химических классов. Полученные данные вполне согласуются с результатами оценки лекарственной чувствительности/устойчивости, определенной с использованием дисков. Проведенные исследования открывают некоторые перспективы для исследования природной перекрестной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

4.3.4. Заключение к разделу 4.3.

Воздействие канамицина в малой концентрации (не влияющей на скорость роста) на клетки *M. smegmatis* mc^2 155 приводит к развитию перекрестной лекарственной устойчивости к фторхинолонам: спарфлоксацину и норфлоксацину; β-лактамному антибиотику имипенему, а также к макролиду – спирамицину. Другой представитель группы аминогликозидов – стрептомицин индуцирует развитие перекрестной лекарственной устойчивости к рифампицину.

Представитель класса фторхинолонов – офлоксацин индуцирует перекрестную лекарственную устойчивость к аминогликозидным антибиотикам: нетилмицину, изепамицину и стрептомицину, β-лактамному меропенему и антибиотику группы азалидов- линезолиду.

Тетрациклин, инициирует повышение уровня лекарственной устойчивости ко всем классам антибиотиков.

Эритромицин в малых концентрациях индуцирует лекарственную устойчивость к антибиотикам собственного класса - макролидов. Помимо антибиотиков, к которым повышался уровень лекарственной устойчивости в условиях индукции, были антибиотики, к которым уровень лекарственной устойчивости понижался. В данной работе, нами предложено расширить

понятие «адъювантов» и включить в их состав антибиотики (в концентрациях, в которых антибиотики не влияют на рост культуры).

Результаты, полученные после обнаружения эффекта перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155, были использованы для составления каталога генов, потенциально, определяющих такой тип лекарственной устойчивости. Сформированный каталог включает в себя гены транскрипционных регуляторов, а также гены антибиотикотолерантности (модули токсин-антитоксин).

Далее, для подтверждения роли выбранных генов в регуляции перекрестной лекарственной устойчивости, был проведен анализ уровня транскрипции этих генов при добавлении стрептомицина, канамицина или офлоксацина. На основе полученных профилей экспрессии генов были построены генетические сети, учитывающие связи отобранных транскрипционных факторов с подконтрольными генами.

Заключение

В нашей работе мы исследовали явление перекрестной лекарственной устойчивости *M. smegmatis* mc^2 155 в присутствии низких концентраций антибиотиков различных химических классов (стрептомицин, канамицин, офлоксацин, тетрациклин и эритромицин), Таблица 5.1.

Таблица 5.1. Перекрестная лекарственная устойчивость индуцированная низкими концентрациями антибиотиков

Антибиотик-индуктор	Снижение чувствительности, класс антибиотика				
Тетрациклин	Фторхинолоны	Азалиды	Тетрациклины	Макролиды	Аминогликозиды
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

Для исследования генетических систем, участвующих в реализации перекрестной лекарственной устойчивости, индуцируемой стрептомицином, канамицином и офлоксацином, нами были отобраны гены-кандидаты, потенциально вовлеченные в реализацию природной перекрестной лекарственной устойчивости у *M. smegmatis* mc^2 155. Был проведен их транскрипционный анализ в присутствии выбранных антибиотиков (в низких концентрациях) в поздней *log*-фазе роста культуры *M. smegmatis* mc^2 155. Для анализа исходя из литературных данных, выбраны 11 генов транскрипционных регуляторов, модификаторов лекарств и т.д., а также 4$^{-е}$ гена модулей систем токсин-антитоксин II типа (*phd/doc*, *vapBC2*, *vapBC30*, *mazEF*). По результатам анализа уровней транскрипции отобранных генов была составлена схема индукции, а также генетическая сеть, потенциально определяющая природную

перекрестную лекарственную устойчивость. Аналогично был изучен уровень экспрессии генов антибиотикотолерантности и составлена схема индукции/репрессии 2^{-x} модулей ТА. Транскрипционный анализ показал значимые (по выбранным критериям) изменения в уровне экспрессии 15 генов и генных модулей при воздействии на клетки *M. smegmatis* канамицином и офлоксацином. Антибиотики в малых дозах индуцировали экспрессию гена *whiB7*, а также генов систем токсин-антитоксин: *vapBC2* и *phd/doc*. Нами было детектировано снижение уровня экспрессии 6 генов, транскрипционных факторов, в присутствии офлоксацина. Наиболее сильное снижение экспрессии наблюдалось в случае с геном нуклеотид-ассоциированного белка *napM*, потенциально связанного с процессом репликации ДНК *M. smegmatis*. Впервые было показано участие модуля ТА – VapBC2 в клеточном ответе на стресс, вызываемый антибиотиками. Анализ профиля экспрессии отобранных генов показал, что основным фактором, определяющим перекрестную лекарственную устойчивость, является транскрипционный активатор WhiB7, определяющий экспрессию генов собственного регулона.

Методами биоинформатического и статистического анализа, а также анализа ДНК последовательностей 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. Проведено полногеномное секвенирование геномов клинических изолятов *M. tuberculosis*, охарактеризованных по спектру лекарственной устойчивости и анамнезу пациента, для поиска корреляции между клинически представленным фенотипом и мутациями в генах резистома.

В результате для проведения функционального анализа были отобраны аллельные варианты генов регулона WhiB7. Среди отобранных аллелей была выделена мутация в гене *whiB7*, приводящая к инактивации продукта консервативного гена. Также среди маркерных мутаций была обнаружена

мутация (инсерция) в гене регулона WhiB7 – *tap*, являющаяся характерной для генотипической группы Beijing.

Отобранные варианты, а также малоизученный ген регулона WhiB7 - *Rv1473*, кодирующий клеточный транспортер, были исследованы на возможность влиять на уровень лекарственной устойчивости модельного объекта *M. smegmatis* mc^2 155.

Впервые показано, что экспрессия гена *whiB7 M. tuberculosis* в клетках *M. smegmatis* приводит к повышению уровня лекарственной устойчивости не только к макролидам, аминогликозиднам, фениколам и тетрациклинам, но и к β-лактамным антибиотикам.

Экспрессия гена *tap M. tuberculosis* в клетках *M. smegmatis* приводит к повышению уровня лекарственной устойчивости кроме как к аминогликозидам и тетрациклинам, еще и к макролидам и фторхинолонам, что являлось ранее неизученным.

Экспрессия гена *Rv1473 M. tuberculosis* в клетках *M. smegmatis* приводит к повышению уровня лекарственной устойчивости не только к уже описанным антибиотикам – макролидам, но и к фторхинолонам, аминогликозидам, азалидам и линкомицину – синтетическому антибиотику, что не было показано ранее.

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

Выводы

По итогам проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. В результате сравнительного геномного анализа составлен список 43 полиморфных генов резистома *M. tuberculosis* (*whiB-like*, *aph*, гены клеточных транспортеров, модификаторов мишеней и лекарств);
2. Установлена корреляция дефектных вариантов генов регулона WhiB7 (*whiB7*ΔG_{191} и *tap*(insC_{581}) 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* mc^2 155 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 резистома: индуцируют экспрессию *whiB7* и генов модулей систем токсин-антитоксин II типа - *phd/doc* и *vapBC2*; офлоксацин снижает уровень экспрессии генов: *napM, tetR, araC, ltmA, marR, mtrA.*
6. Составлена предполагаемая схема генетического контроля природной лекарственной устойчивости и антибиотикотолерантности *M. smegmatis* mc^2 155 на основе изменения экспрессионного профиля 11 генов резистома (*whiB7, napM, ltmA, tetR, rbpA, mtrA, mfpB, lfrR, marR, araC, blaS*) и 4 генов модулей токсин-антитоксин (*mazEF*, *phd/doc*, *vapBC30*, *vapBC2*);

Список сокращений, использованных в работе

МТК - микобактерии туберкулезного комплекса

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

ТЛУ – тотальная лекарственная устойчивость

ТА – токсин-антитоксин

Ацетил-CoA – ацетилокофермент А

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса или лимонной кислоты)

ПСБ - пенициллин-связывающие белки

ОГД - 2-оксоглуторат дегидрогеназы

НАД$^+$(Н) - Никотинамидадениндинуклеотид

КГД - α-кетоглуторатдекарбоксилаза

ГС – глутаматсинтазы

СТПК – серин-треониновая протеинкиназа

APH – аминогликозидфосфотрансфераза (aminoglycoside phosphotransferase)

SDS – лаурилсульфат натрия

TAE – Трис-ацетатный буфер

EDTA – ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

IPTG - Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

LB - литическая среда (lysogeny broth)

PBS - Натрий-фосфатный буфер

PMSF - Фенилметилсульфонилфторид

PSA - Пероксодисульфат аммония

TEMED – тетраметилэтилендиамин

Словарь терминов

- Адъювант антибиотиков – вещество, не антибиотик, усиливающее эффект производимый антибиотиком
- Генная сеть - группы координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом как через свои первичные продукты (РНК и белки), так и через разнообразные метаболиты и другие вторичные продукты функционирования генных сетей.
- Индукция устойчивости – клеточный ответ бактерии на действие антибиотика в концентрациях, не влияющих на скорость роста.
- Лекарственная устойчивость – невосприимчивость к антибактериальному действию антибиотиков
- Перекрестная лекарственная устойчивость - возникновение устойчивости к одному препарату влечёт за собой устойчивость к другим препаратам.
- Резистом – совокупность генов лекарственной устойчивости у патогенных и непатогенных бактерий
- Толерантность к антибиотикам - способность микроорганизмов существовать в присутствии токсичных химиопрепаратов из-за уменьшенного количества аутолитических ферментов без сохранения способности к размножению.

Список Литературы

1. Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Маслов Д.А. Тест-Система Mycobacterium smegmatis aphVIII+ для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа // 2012 патент RU 2566998.
2. Прозоров А.А., Зайчикова М.В., Даниленко В.Н. Мутанты Mycobacterium tuberculosis с множественной лекарственной устойчивостью: история появления, генетические и молекулярные механизмы устойчивости, возникающие проблемы // ГЕНЕТИКА. 2012, 48(1), Pp. 1–16.
3. Прозоров А.А., Даниленко В.Н. Системы “токсин–антитоксин" у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма? // 2010, 75(47).
4. Прозоров А.А., Даниленко В.Н. Микобактерии туберкулёзного комплекса: геномика, молекулярная эпидемиология, пути эволюции. // Успехи современной биологии . 2011, N 3, Pp. 227–243.
5. Abdelaal A., El-Ghaffar H.A., Zaghloul M.H.E., Mashad N. El, Badran E., Fathy A. Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains by DNA sequencing: a randomized trial. // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2009, 8, Pp. 4.
6. Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. // Annu. Rev. Microbiol. 2008, 62, Pp. 53–70.
7. Ahidjo B.A., Kuhnert D., McKenzie J.L., Machowski E.E., Gordhan B.G., Arcus V., Abrahams G.L., Mizrahi V. VapC toxins from Mycobacterium tuberculosis are ribonucleases that differentially inhibit growth and are neutralized by cognate VapB antitoxins. // PLoS One. 2011, 6(6), Pp. e21738.
8. Ahmad S., El-Shazly S., Mustafa A.S., Al-Attiyah R. Mammalian cell-entry proteins encoded by the mce3 operon of Mycobacterium tuberculosis are expressed during natural infection in humans // Scand. J. Immunol. 2004, 60(4), Pp. 382–391.
9. Alam M.S., Garg S.K., Agrawal P. Molecular function of WhiB4/Rv3681c of

Mycobacterium tuberculosis H37Rv: a [4Fe-4S] cluster co-ordinating protein disulphide reductase. // Mol. Microbiol. 2007, 63(5), Pp. 1414–31.
10. Alam M.S., Garg S.K., Agrawal P. Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv // FEBS J. 2009, 276(1), Pp. 76–93.
11. Alangaden G.J., Kreiswirth B.N., Aouad A., Khetarpal M., Igno F.R., Moghazeh S.L., Manavathu E.K., Lerner S.A. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. // Antimicrob. Agents Chemother. 1998, 42(5), Pp. 1295–7.
12. Albrethsen J., Agner J., Piersma S.R., Højrup P., Pham T. V, Weldingh K., Jimenez C.R., Andersen P., Rosenkrands I. Proteomic profiling of Mycobacterium tuberculosis identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. // Mol. Cell. Proteomics. 2013, 12, Pp. 1180–91.
13. Alekshun M.N., Levy S.B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. // Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41(10), Pp. 2067–75.
14. Alland D., Whittam T.S., Murray M.B., Cave M.D., Hazbon M.H., Dix K., Kokoris M., Duesterhoeft A., Eisen J.A., Fraser C.M., Fleischmann R.D. Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: Application to Mycobacterium tuberculosis evolution and pathogenesis // J. Bacteriol. 2003, 185(11), Pp. 3392–9.
15. Altaf M., Miller C.H., Bellows D.S., O'Toole R. Evaluation of the Mycobacterium smegmatis and BCG models for the discovery of Mycobacterium tuberculosis inhibitors. // Tuberculosis (Edinb). 2010, 90(6), Pp. 333–7.
16. Andersen A.B., Hansen E.B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of Mycobacterium tuberculosis. // Infect. Immun. 1989, 57(8), Pp. 2481–8.
17. Andre E., Goeminne L., Cabibbe A., Beckert P., Kabamba Mukadi B., Mathys V., Gagneux S., Niemann S., Ingen J. Van, Cambau E. Consensus numbering system

for the rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria // Clin. Microbiol. Infect. 2017, 23(3), Pp. 167–72.
18. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Göhlmann H.W.H., Neefs J.-M., Winkler H., Gestel J. Van, Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., Chaffoy D. de, Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. // Science. 2005, 307(5707), Pp. 223–7.
19. Andries K., Villellas C., Coeck N., Thys K., Gevers T., Vranckx L., Lounis N., Jong B.C. De, Koul A. Acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline // PLoS One. 2014, 9(7).
20. Andriole V.T. The Quinolones: Past, Present, and Future // Clin. Infect. Dis. 2005, 41(Supplement 2), Pp. S113–S119.
21. Aono A., Azuma Y., Mitarai S., Ogata H. Rapid prediction of BACTEC MGIT 960 culture results by COBAS amplicor mycobacterium polymerase chain reaction detection. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2009, 64(1), Pp. 27–30.
22. Aravind L., Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. // Nucleic Acids Res. 1998, 26(19), Pp. 4413–21.
23. Bajaj R.A., Arbing M.A., Shin A., Cascio D., Miallau L. Crystal structure of the toxin Msmeg_6760, the structural homolog of Mycobacterium tuberculosis Rv2035, a novel type II toxin involved in the hypoxic response. // Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun. 2016, 72(Pt 12), Pp. 863–9.
24. Balasubramanian V., Wiegeshaus E.H., Smith D.W. Growth characteristics of recent sputum isolates of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs infected by the respiratory route // Infect. Immun. 1992, 60(11), Pp. 4762–7.
25. Banaiee N., Jacobs W.R., Ernst J.D. Regulation of Mycobacterium tuberculosis whiB3 in the mouse lung and macrophages // Infect. Immun. 2006, 74(11), Pp. 6449–57.
26. Bang D., Bengård Andersen A., Thomsen V.Ø. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis directly in clinical

specimens. // J. Clin. Microbiol. 2006, 44(7), Pp. 2605–8.
27. Bartek I.L., Woolhiser L.K., Baughn A.D., Basaraba R.J., Jacobs W.R., Lenaerts A.J., Voskuil M.I. Mycobacterium tuberculosis Lsr2 is a global transcriptional regulator required for adaptation to changing oxygen levels and virulence. // MBio. 2014, 5(3), Pp. e01106-14.
28. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray // Science (80-.). 1999, 284(5419), Pp. 1520–1523.
29. Bekker O.B., Sokolov D.N., Luzina O.A., Komarova N.I., Gatilov Y. V., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Maslov D.A., Chernousova L.N., Salakhutdinov N.F., Danilenko V.N. Synthesis and activity of (+)-usnic acid and (−)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against Mycobacterium tuberculosis // Med. Chem. Res. 2015, 24(7), Pp. 2926–2938.
30. Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T., Takayama K., Brennan P.J., Besra G.S. Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis. // Science. 1997, 276(5317), Pp. 1420–2.
31. Bernal P., Molina-Santiago C., Daddaoua A., Llamas M.A. Antibiotic adjuvants: identification and clinical use // Microb. Biotechnol. 2013, 6(5), Pp. 445–449.
32. Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. // Mol. Microbiol. 2002, 43(3), Pp. 717–31.
33. Biukovic G., Basak S., Manimekalai M.S.S., Rishikesan S., Roessle M., Dick T., Rao S.P.S., Hunke C., Grüber G. Variations of subunit {varepsilon} of the Mycobacterium tuberculosis F1Fo ATP synthase and a novel model for mechanism of action of the tuberculosis drug TMC207. // Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57(1), Pp. 168–76.
34. Blokpoel M.C.J., Murphy H.N., O’Toole R., Wiles S., Runn E.S.C., Stewart G.R., Young D.B., Robertson B.D. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. // Nucleic Acids Res. 2005, 33(2), Pp. e22.

35. Bowman J., Ghosh P. A complex regulatory network controlling intrinsic multidrug resistance in Mycobacterium smegmatis // Mol. Microbiol. 2014, 91(1), Pp. 121–134.
36. Braibant M., Gilot P., Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis. // FEMS Microbiol. Rev. 2000, 24(4), Pp. 449–67.
37. Brennan P.J., Nikaido H. The envelope of mycobacteria. // Annu. Rev. Biochem. 1995, 64, Pp. 29–63.
38. Brossier F., Boudinet M., Jarlier V., Petrella S., Sougakoff W. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis // Tuberculosis. 2016, 100, Pp. 15–24.
39. Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajoj S. a, Allix C., Aristimuño L., Arora J., Baumanis V., Binder L., Cafrune P., Cataldi A., Cheong S., Diel R., Ellermeier C., Evans J.T., Fauville-Dufaux M., Ferdinand S., et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. // BMC Microbiol. 2006, 6, Pp. 23.
40. Buchmeier N.A., Newton G.L., Koledin T., Fahey R.C. Association of mycothiol with protection of Mycobacterium tuberculosis from toxic oxidants and antibiotics. // Mol. Microbiol. 2003, 47(6), Pp. 1723–32.
41. Burian J., Ramón-García S., Sweet G., Gómez-Velasco A., Av-Gay Y., Thompson C.J. The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance // J. Biol. Chem. 2012, 287(1), Pp. 299–310.
42. Burian J., Yim G., Hsing M., Axerio-Cilies P., Cherkasov A., Spiegelman G.B., Thompson C.J. The mycobacterial antibiotic resistance determinant WhiB7 acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor SigA (RpoV) // Nucleic Acids Res. 2013, 41(22), Pp. 10062–10076.

43. Buriánková K., Doucet-Populaire F., Dorson O., Gondran A., Ghnassia J.-C., Weiser J., Pernodet J.-L. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. // Antimicrob. Agents Chemother. 2004, 48(1), Pp. 143–50.
44. Casali N., White A.M., Riley L.W. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis mce1 operon // J. Bacteriol. 2006, 188(2), Pp. 441–449.
45. Casonato S., Sánchez A.C., Haruki H., González M.R., Provvedi R., Dainese E., Jaouen T., Gola S., Bini E., Vicente M., Johnsson K., Ghisotti D., Palù G., Hernández-Pando R., Manganelli R. WhiB5, a transcriptional regulator that contributes to Mycobacterium tuberculosis virulence and reactivation // Infect. Immun. 2012, 80(9), Pp. 3132–3144.
46. Chambers H.F., Moreau D., Yajko D., Miick C., Wagner C., Hackbarth C., Kocagöz S., Rosenberg E., Hadley W.K., Nikaido H. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? // Antimicrob. Agents Chemother. 1995, 39(12), Pp. 2620–4.
47. Champion M.M., Williams E.A., Pinapati R.S., Champion P.A.D. Correlation of Phenotypic Profiles Using Targeted Proteomics Identifies Mycobacterial Esx-1 Substrates // J. Proteome Res. 2014, 13(11), Pp. 5151–5164.
48. Champoux J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. // Annu. Rev. Biochem. 2001, 70, Pp. 369–413.
49. Chao J., Wong D., Zheng X., Poirier V., Bach H., Hmama Z., Av-Gay Y. Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis. // Biochim. Biophys. Acta. 2010, 1804(3), Pp. 620–7.
50. Chawla M., Parikh P., Saxena A., Munshi M., Mehta M., Mai D., Srivastava A.K., Narasimhulu K. V, Redding K.E., Vashi N., Kumar D., Steyn A.J.C., Singh A. Mycobacterium tuberculosis WhiB4 regulates oxidative stress response to modulate survival and dissemination in vivo. // Mol. Microbiol. 2012, 85(6), Pp. 1148–65.
51. Chen W., Biswas T., Porter V.R., Tsodikov O. V., Garneau-Tsodikova S. Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-

TB // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011, 108(24), Pp. 9804.
52. Colangeli R., Haq A., Arcus V.L., Summers E., Magliozzo R.S., McBride A., Mitra A.K., Radjainia M., Khajo A., Jacobs W.R., Salgame P., Alland D. The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009, 106(11), Pp. 4414–8.
53. Colangeli R., Helb D., Vilchèze C., Hazbón M.H., Lee C.-G., Safi H., Sayers B., Sardone I., Jones M.B., Fleischmann R.D., Peterson S.N., Jacobs W.R., Alland D. Transcriptional regulation of multi-drug tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in M. tuberculosis. // PLoS Pathog. 2007, 3(6), Pp. e87.
54. Cole, Stewart T. Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex // Microbiology. 2002, 148, Pp. 2919–2928.
55. Cooper C.B. Development of mycobacterium tuberculosis whole cell screening hits as potential antituberculosis agents // J. Med. Chem. 2013, 56(20), Pp. 7755–7760.
56. Coscolla M., Gagneux S. Consequences of genomic diversity in mycobacterium tuberculosis // Semin. Immunol. 2014. T. 26. № 6. C. 431–444.
57. Croxatto A., Prod’hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. // FEMS Microbiol. Rev. 2012, 36(2), Pp. 380–407.
58. Cruciani M., Scarparo C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. // J. Clin. Microbiol. 2004, 42(5), Pp. 2321–5.
59. Davis N.K., Chater K.F. The Streptomyces coelicolor whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. // Mol. Gen. Genet. 1992, 232(3), Pp. 351–8.
60. Demple B. The Nexus of Oxidative Stress Responses and Antibiotic Resistance Mechanisms in Escherichia coli and Salmonella // Frontiers in Antimicrobial Resistance. : American Society of Microbiology. C. 191–197.

61. Deoghare S. Bedaquiline: A new drug approved for treatment of multidrug-resistant tuberculosis // Indian J. Pharmacol. 2013, 45(5), Pp. 536.
62. Dick T., Lee B.H., Murugasu-Oei B. Oxygen depletion induced dormancy in Mycobacterium smegmatis // FEMS Microbiol. Lett. 1998, 163(2), Pp. 159–164.
63. Dillon N.A., Peterson N.D., Rosen B.C., Baughn A.D. Pantothenate and pantetheine antagonize the antitubercular activity of pyrazinamide. // Antimicrob. Agents Chemother. 2014, 58(12), Pp. 7258–63.
64. Dove S.L., Darst S.A., Hochschild A. Region 4 of sigma as a target for transcription regulation. // Mol. Microbiol. 2003, 48(4), Pp. 863–74.
65. Duncan K., Barry C.E. Prospects for new antitubercular drugs. // Curr. Opin. Microbiol. 2004, 7(5), Pp. 460–5.
66. Edwards S., Glynn P., David M.D., Kamesh L. Diagnosing Tuberculous Peritonitis Early in Patients on Peritoneal Dialysis: Use of Xpert MTB/RIF Assay. // Perit. Dial. Int., 36(4), Pp. 461–463.
67. El-Sayed A., El-Shannat S., Kamel M., Castañeda-Vazquez M.A., Castañeda-Vazquez H. Molecular Epidemiology of Mycobacterium bovis in Humans and Cattle // Zoonoses Public Health. 2015, 63(4), Pp. 251–64.
68. Eliopoulos G.M., Eliopoulos C.T. Antibiotic combinations: should they be tested? // Clin. Microbiol. Rev. 1988, 1(2), Pp. 139–56.
69. Ellis R.C., Zabrowarny L.A. Safer staining method for acid fast bacilli. // J. Clin. Pathol. 1993, 46(6), Pp. 559–560.
70. Embden J.D.A. Van, Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M., Small P.M. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. 1993. T. 31. № 2. C. 406–409.
71. Engohang-Ndong J., Baillat D., Aumercier M., Bellefontaine F., Besra G.S., Locht C., Baulard A.R. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator //

Mol. Microbiol. 2004. Т. 51. № 1. С. 175–188.
72. Etienne G., Laval F., Villeneuve C., Dinadayala P., Abouwarda A., Zerbib D., Galamba A., Daffé M. The cell envelope structure and properties of Mycobacterium smegmatis mc2155: Is there a clue for the unique transformability of the strain? // Microbiology. 2005, 151(6), Pp. 2075–2086.
73. Evangelopoulos D., Gupta A., Lack N.A., Maitra A., Bokum A.M.C. Ten, Kendall S., Sim E., Bhakta S. Characterisation of a putative AraC transcriptional regulator from Mycobacterium smegmatis // Tuberculosis. 2014, 94(6), Pp. 664–671.
74. Fay A., Glickman M.S. An Essential Nonredundant Role for Mycobacterial DnaK in Native Protein Folding // PLoS Genet. 2014, 10(7).
75. Ferber D. Protein That Mimics DNA Helps Tuberculosis Bacteria Resist Antibiotics // Science (80-.). 2005, 308(5727).
76. Flores A.R., Parsons L.M., Pavelka M.S. Genetic analysis of the beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis and susceptibility to beta-lactam antibiotics. // Microbiology. 2005, 151(Pt 2), Pp. 521–32.
77. Frampton R., Aggio R.B.M., Villas-Bôas S.G., Arcus V.L., Cook G.M. Toxin-antitoxin systems of Mycobacterium smegmatis are essential for cell survival. // J. Biol. Chem. 2012, 287(8), Pp. 5340–56.
78. Fuhrmann M., Hausherr A., Ferbitz L., Schodl T., Heitzer M., Hegemann P. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii by using a synthetic luciferase reporter gene // Plant Mol Biol. 2004, 55(6), Pp. 869–881.
79. Gao L.-Y., Laval F., Lawson E.H., Groger R.K., Woodruff A., Morisaki J.H., Cox J.S., Daffe M., Brown E.J. Requirement for kasB in Mycobacterium mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. // Mol. Microbiol. 2003, 49(6), Pp. 1547–63.
80. Garg S.K., Suhail Alam M., Soni V., Radha Kishan K., Agrawal P. Characterization of Mycobacterium tuberculosis WhiB1/Rv3219 as a protein

disulfide reductase // 2006.
81. Geiman D.E., Raghunand T.R., Agarwal N., Bishai W.R. Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven Mycobacterium tuberculosis whiB-like genes // Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 50(8), Pp. 2836–2841.
82. Gill E.E., Franco O.L., Hancock R.E.W. Antibiotic Adjuvants: Diverse Strategies for Controlling Drug-Resistant Pathogens // Chem. Biol. Drug Des. 2015, 85(1), Pp. 56–78.
83. Golden M.P., Vikram H.R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. // Am. Fam. Physician. 2005, 72(9), Pp. 1761–8.
84. Gomez J.E., Bishai W.R. whmD is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000, 97(15), Pp. 8554–9.
85. Grkovic S., Brown M.H., Roberts N.J., Paulsen I.T., Skurray R. a. QacR is a repressor protein that regulates expression of the Staphylococcus aureus multidrug efflux pump QacA. // J. Biol. Chem. 1998, 273(29), Pp. 18665–18673.
86. Grumezescu A.M., Ghitulica C.D., Voicu G., Huang K.-S., Yang C.-H., Ficai A., Vasile B.S., Grumezescu V., Bleotu C., Chifiriuc M.C. New silica nanostructure for the improved delivery of topical antibiotics used in the treatment of staphylococcal cutaneous infections // Int. J. Pharm. 2014, 463(2), Pp. 170–176.
87. Gupta A. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin-antitoxin loci of Mycobacterium tuberculosis // FEMS Microbiol. Lett. 2009, 290(1), Pp. 45–53.
88. Han J.S., Lee J.J., Anandan T., Zeng M., Sripathi S., Jahng W.J., Lee S.H., Suh J.W., Kang C.M. Characterization of a chromosomal toxin-antitoxin, Rv1102c-Rv1103c system in Mycobacterium tuberculosis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010, 400(3), Pp. 293–298.
89. Hancock R.E.W., Nijnik A., Philpott D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections // Nat. Rev. Microbiol. 2012, 10(4), Pp. 243–254.

90. Hartkoorn R.C., Uplekar S., Cole S.T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of mmpl5 in mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. 2014, 58(5), Pp. 2979–2981.
91. Hegde S.S., Vetting M.W., Roderick S.L., Mitchenall L.A., Maxwell A., Takiff H.E., Blanchard J.S. A Fluoroquinolone Resistance Protein from Mycobacterium tuberculosis That Mimics DNA // Science (80-.). 2005, 308(5727).
92. Heifets L., Lindholm-Levy P. Comparison of bactericidal activities of streptomycin, amikacin, kanamycin, and capreomycin against Mycobacterium avium and M. tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. 1989, 33(8), Pp. 1298–1301.
93. Heifets L., Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant Mycobacterium tuberculosis bacterial populations. // Am. Rev. Respir. Dis. 1992, 145(5), Pp. 1223–5.
94. Hengst C.D. den, Buttner M.J. Redox control in actinobacteria // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 2008, 1780(11), Pp. 1201–1216.
95. Hijum S.A.F.T. van, Medema M.H., Kuipers O.P. Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2009, 73(3), Pp. 481–509, Table of Contents.
96. Hirano K., Takahashi M., Kazumi Y., Fukasawa Y., Abe C. Mutation in pncA is a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Tuber. Lung Dis. 1997, 78(2), Pp. 117–22.
97. Hoffmann C., Leis A., Niederweis M., Plitzko J.M., Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 105(10), Pp. 3963–7.
98. Homolka S., Niemann S., Russell D.G., Rohde K.H. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. // PLoS Pathog. 2010, 6(7), Pp. e1000988.
99. Homolka S., Projahn M., Feuerriegel S., Ubben T., Diel R., Nubel U., Niemann

S. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms // PLoS One. 2012, 7(7), Pp. e39855.

100. Houghton J.L., Green K.D., Pricer R.E., Mayhoub A.S., Garneau-Tsodikova S. Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial Eis enzymes // J. Antimicrob. Chemother. 2013, 68(4), Pp. 800.

101. Hu Y., Morichaud Z., Chen S., Leonetti J.-P., Brodolin K. Mycobacterium tuberculosis RbpA protein is a new type of transcriptional activator that stabilizes the A-containing RNA polymerase holoenzyme // Nucleic Acids Res. 2012, 40(14), Pp. 6547–6557.

102. Huang K.-H., Durand-Heredia J., Janakiraman A. FtsZ ring stability: of bundles, tubules, crosslinks, and curves. // J. Bacteriol. 2013, 195(9), Pp. 1859–68.

103. Hunter S.W., Gaylord H., Brennan P.J. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. // J. Biol. Chem. 1986, 261(26), Pp. 12345–51.

104. Jagielski T., Ingen J. van, Rastogi N., Dziadek J., Mazur P.K., Bielecki J. Current methods in the molecular typing of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. // Biomed Res. Int. 2014, 2014, Pp. 645802.

105. Jakimowicz P., Cheesman M.R., Bishai W.R., Chater K.F., Thomson A.J., Buttner M.J. Evidence that the Streptomyces developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster. // J. Biol. Chem. 2005, 280(9), Pp. 8309–15.

106. Jarlier V., Gutmann L., Nikaido H. Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in Mycobacterium chelonae. // Antimicrob. Agents Chemother. 1991, 35(9), Pp. 1937.

107. Jiang X., Zhang W., Gao F., Huang Y., Lv C., Wang H. Comparison of the proteome of isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis. // Microb. Drug Resist. 2006, 12(4), Pp. 231–8.

108. Johansen S.K., Maus C.E., Plikaytis B.B., Douthwaite S. Capreomycin binds

across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2’-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. // Mol. Cell. 2006, 23(2), Pp. 173–82.

109. Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. NCBI BLAST: a better web interface. // Nucleic Acids Res. 2008, 36(Web Server issue), Pp. W5-9.

110. Kalan L., Wright G.D., Livermore D.M., Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J., Arias C.A., Murray B.E., Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., et al. Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies // Expert Rev. Mol. Med. 2011, 13(Supplement 1), Pp. e5.

111. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., Agterveld M. Van, Soolingen D. Van, Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Embden J. Van. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology // J. Clin. Microbiol. 1997, 35(4), Pp. 907–914.

112. Kasik J.E., Peacham L. Properties of beta-lactamases produced by three species of mycobacteria. // Biochem. J. 1968, 107(5), Pp. 675–82.

113. Kassa D., Ran L., Geberemeskel W., Tebeje M., Alemu A., Selase A., Tegbaru B., Franken K.L.M.C., Friggen A.H., Meijgaarden K.E. van, Ottenhoff T.H.M., Wolday D., Messele T., Baarle D. van. Analysis of immune responses against a wide range of Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active pulmonary tuberculosis. // Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19(12), Pp. 1907–15.

114. Khisimuzi Mdluli B.S.P., Zhenkun Ma B.S.P. Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase as a Target for Drug Discovery // Infect. Disord. - Drug Targets. 2007, 7(2), Pp. 159–168.

115. Kim K.H., An D.R., Song J., Yoon J.Y., Kim H.S., Yoon H.J., Im H.N., Kim J., Kim D.J., Lee S.J., Kim K.-H., Lee H.-M., Kim H.-J., Jo E.-K., Lee J.Y., Suh S.W. Mycobacterium tuberculosis Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109(20), Pp. 7729.

116. King G.M. Uptake of Carbon Monoxide and Hydrogen at Environmentally Relevant Concentrations by Mycobacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69(12), Pp. 7266–7272.

117. Koch A., Mizrahi V., Warner D.F. The impact of drug resistance on Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? // Emerg. Microbes Infect. 2014, 3(3), Pp. e17.

118. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. // Nat. Rev. Microbiol. 2010, 8(6), Pp. 423–35.

119. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics // Cell. 2007, 130(5), Pp. 797–810.

120. Konar M., Alam M.S., Arora C., Agrawal P. WhiB2/Rv3260c, a cell division-associated protein of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, has properties of a chaperone. // FEBS J. 2012, 279(15), Pp. 2781–92.

121. Kondratieva T., Azhikina T., Nikonenko B., Kaprelyants A., Apt A. Latent tuberculosis infection: What we know about its genetic control? // Tuberculosis. 2014, 94(5), Pp. 462–468.

122. Kumar K. Spinal tuberculosis, natural history of disease, classifications and principles of management with historical perspective. // Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol. orthopédie Traumatol. 2016, 26(6), Pp. 551–8.

123. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. // Mol. Biol. Evol. 2016, Pp. msw054.

124. Larsen M.H., Vilchèze C., Kremer L., Besra G.S., Parsons L., Salfinger M., Heifets L., Hazbon M.H., Alland D., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Overexpression of *inhA* , but not *kasA* , confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis* , *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* // Mol. Microbiol. 2002, 46(2), Pp. 453–466.

125. Larsson C., Luna B., Ammerman N.C., Maiga M., Agarwal N., Bishai W.R. Gene expression of mycobacterium tuberculosis putative transcription factors

whib1-7 in redox environments // PLoS One. 2012, 7(7).
126. Lawn S.D. Point-of-care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV-associated tuberculosis: a state of the art review. // BMC Infect. Dis. 2012, 12, Pp. 103.
127. Lawn S.D., Zumla A.I. Tuberculosis. // Lancet. 2011, 378(9785), Pp. 57–72.
128. Lawrence Paul Garrod, Francis O'Grady, Mary Barber. Antibiotic and chemotherapy. Livingstone: , 1968. 475 c.
129. Leylabadlo H.E., Kafil H.S., Yousefi M., Aghazadeh M., Asgharzadeh M. Pulmonary Tuberculosis Diagnosis: Where We Are? // Tuberc. Respir. Dis. (Seoul). 2016, 79(3), Pp. 134–42.
130. Li W., He Z.G. LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in Mycobacterium smegmatis // Nucleic Acids Res. 2012, 40(22), Pp. 11292–11307.
131. Li X., Zeng R., Tang Q.-Q. Chapter Sixteen – Evaluation of Protein Phosphorylation During Adipogenesis // Methods in Enzymology. , 2014. C. 279–295.
132. Li Y., Zeng J., Zhang H., He Z.-G. The characterization of conserved binding motifs and potential target genes for M. tuberculosis MtrAB reveals a link between the two-component system and the drug resistance of M. smegmatis // BMC Microbiol. 2010, 10(1), Pp. 242.
133. Liu H., Xie J. Comparative Genomics of Mycobacterium tuberculosis Drug Efflux Pumps and Their Transcriptional Regulators // Crit. Rev. TM Eukaryot. Gene Expr. 2014, 24(2), Pp. 163–180.
134. Liu H., Yang M., He Z.-G. Novel TetR family transcriptional factor regulates expression of multiple transport-related genes and affects rifampicin resistance in Mycobacterium smegmatis // Sci. Rep. 2016a, 6(April), Pp. 27489.
135. Liu J., Nikaido H. A mutant of Mycobacterium smegmatis defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999, 96(7), Pp. 4011–6.

136. Liu J., Rosenberg E.Y., Nikaido H. Fluidity of the lipid domain of cell wall from Mycobacterium chelonae. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995, 92(24), Pp. 11254–8.

137. Liu M., Zhang Y., Inouye M., Woychik N.A. Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 105(15), Pp. 5885–90.

138. Liu Y., Wang H., Cui T., Zhou X., Jia Y., Zhang H., He Z.G. NapM, a new nucleoid-associated protein, broadly regulates gene expression and affects mycobacterial resistance to anti-tuberculosis drugs // Mol. Microbiol. 2016b, 101(1), Pp. 167–181.

139. Lomovskaya O., Lewis K., Matin A. EmrR is a negative regulator of the Escherichia coli multidrug resistance pump emrAB // J. Bacteriol. 1995, 177(9), Pp. 2328–2334.

140. Lonnroth, Knut. Systematic screening for active tuberculosis Principles and recommendations.

141. Madsen C.T., Jakobsen L., Buriánková K., Doucet-Populaire F., Pernodet J.-L., Douthwaite S. Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in Mycobacterium tuberculosis. // J. Biol. Chem. 2005, 280(47), Pp. 38942–7.

142. Mak P.A., Rao S.P.S., Ping Tan M., Lin X., Chyba J., Tay J., Ng S.H., Tan B.H., Cherian J., Duraiswamy J., Bifani P., Lim V., Lee B.H., Ling Ma N., Beer D., Thayalan P., Kuhen K., Chatterjee A., Supek F., et al. A high-throughput screen to identify inhibitors of ATP homeostasis in non-replicating Mycobacterium tuberculosis. // ACS Chem. Biol. 2012, 7(7), Pp. 1190–7.

143. Maslov D.A., Zaîchikova 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. 2015, 95(5), Pp. 608–612.

144. Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. Mutation of tlyA confers

capreomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49(2), Pp. 571–7.

145. Mayer C., Takiff H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Microbiol. Spectr. 2014, 2(4), Pp. MGM2-0009-2013.

146. Mayuri, Bagchi G., Das T.K., Tyagi J.S. Molecular analysis of the dormancy response in Mycobacterium smegmatis: Expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone ??-crystallin homologues // FEMS Microbiol. Lett. 2002, 211(2), Pp. 231–237.

147. McArthur A.G., Wright G.D. Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology // Curr. Opin. Microbiol. 2015, 27, Pp. 45–50.

148. Mdluli K., Slayden R.A., Zhu Y., Ramaswamy S., Pan X., Mead D., Crane D.D., Musser J.M., Barry C.E. Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis β-Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid // Science (80-.). 1998, 280(5369).

149. Mehta M., Rajmani R.S., Singh A. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 Responds to Vacuolar pH-induced Changes in Mycothiol Redox Potential to Modulate Phagosomal Maturation and Virulence. // J. Biol. Chem. 2016, 291(6), Pp. 2888–903.

150. Méndez-Samperio P. Global efforts in the development of vaccines for tuberculosis: Requirements for improved vaccines against Mycobacterium tuberculosis. // Scand. J. Immunol. 2016.

151. Michele T.M., Ko C., Bishai W.R. Exposure to antibiotics induces expression of the Mycobacterium tuberculosis sigF gene: implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. // Antimicrob. Agents Chemother. 1999, 43(2), Pp. 218–25.

152. Minion J., Leung E., Talbot E., Dheda K., Pai M., Menzies D. Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: systematic review and meta-analysis. // Eur. Respir. J. 2011, 38(6), Pp. 1398–405.

153. Mitchison D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course

chemotherapy. // Tubercle. 1985, 66(3), Pp. 219–25.
154. Mitchison D.A., Wallace J.G., Bhatia A.L., Selkon J.B., Subbaiah T. V, Lancaster M.C. A comparison of the virulence in guinea-pigs of South Indian and British tubercle bacilli // Tubercle. 1960, 41, Pp. 1–22.
155. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L., Suffys P.N., Shen A.D., Vishnevsky B. Russian «successful» clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A multiplex PCR assay for rapid detection and global screening // J. Clin. Microbiol. 2012, 50(11), Pp. 3757–3759.
156. Montero C., Mateu G., Rodriguez R., Takiff H. Intrinsic Resistance of Mycobacterium smegmatis to Fluoroquinolones May Be Influenced by New Pentapeptide Protein MfpA // Antimicrob. Agents Chemother. 2001, 45(12), Pp. 3387.
157. Moore D.A.J., Evans C.A.W., Gilman R.H., Caviedes L., Coronel J., Vivar A., Sanchez E., Piñedo Y., Saravia J.C., Salazar C., Oberhelman R., Hollm-Delgado M.-G., LaChira D., Escombe A.R., Friedland J.S. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. // N. Engl. J. Med. 2006, 355(15), Pp. 1539–50.
158. Morgan M., Kalantri S., Flores L., Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // BMC Infect. Dis. 2005, 5, Pp. 62.
159. Morris R.P., Nguyen L., Gatfield J., Visconti K., Nguyen K., Schnappinger D., Ehrt S., Liu Y., Heifets L., Pieters J., Schoolnik G., Thompson C.J. Ancestral antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005, 102(34), Pp. 12200–5.
160. Müller B., Borrell S., Rose G., Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. // Trends Genet. 2013, 29(3), Pp. 160–9.
161. Mutschler H., Gebhardt M., Shoeman R.L., Meinhart A. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan

synthesis // PLoS Biol. 2011, 9(3).
162. Nahid P., Dorman S.E., Alipanah N., Barry P.M., Brozek J.L., Cattamanchi A., Chaisson L.H., Chaisson R.E., Daley C.L., Grzemska M., Higashi J.M., Ho C.S., Hopewell P.C., Keshavjee S.A., Lienhardt C., Menzies R., Merrifield C., Sotgiu G., Starke J.R., et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis.
163. Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000 [In Process Citation] // Nucleic Acids Res. 2000, 28(1), Pp. 292.
164. Nampoothiri K.M., Rubex R., Patel A.K., Narayanan S.S., Krishna S., Das S.M., Pandey A. Molecular cloning, overexpression and biochemical characterization of hypothetical beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. // J. Appl. Microbiol. 2008, 105(1), Pp. 59–67.
165. Nash K.A. Intrinsic macrolide resistance in Mycobacterium smegmatis is conferred by a novel erm gene, erm(38). // Antimicrob. Agents Chemother. 2003, 47(10), Pp. 3053–60.
166. Nash K.A., Zhang Y., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of Mycobacterium fortuitum. // J. Antimicrob. Chemother. 2005, 55(2), Pp. 170–7.
167. Nelson R.M., Long G.L. A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the Thermus aquaticus polymerase chain reaction. // Anal. Biochem. 1989, 180(1), Pp. 147–51.
168. Neu H.C., Fu K.P. Clavulanic acid, a novel inhibitor of beta-lactamases. // Antimicrob. Agents Chemother. 1978, 14(5), Pp. 650–5.
169. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. : Springer Berlin Heidelberg, 2016.
170. Nguyen L., Chinnapapagari S., Thompson C.J. FbpA-Dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall

structure, and colonial morphology of Mycobacterium smegmatis. // J. Bacteriol. 2005, 187(19), Pp. 6603–11.
171. Nguyen L., Thompson C.J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm // Trends Microbiol. 2006, 14(7), Pp. 304–312.
172. Niebisch A., Kabus A., Schultz C., Weil B., Bott M. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. // J. Biol. Chem. 2006, 281(18), Pp. 12300–7.
173. Niobe-Eyangoh S.N., Kuaban C., Sorlin P., Cunin P., Thonnon J., Sola C., Rastogi N., Vincent V., Gutierrez M.C. Genetic biodiversity of Mycobacterium tuberculosis complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon // J. Clin. Microbiol. 2003, 41(6), Pp. 2547–2553.
174. Nishino K., Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli. // J. Bacteriol. 2001, 183(20), Pp. 5803–12.
175. Njire M., Tan Y., Mugweru J., Wang C., Guo J., Yew W., Tan S., Zhang T. Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update // Adv. Med. Sci. 2016, 61(1), Pp. 63–71.
176. Noon A.P., Kulkarni G.S. All Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Strains Are Equal, but Some BCG Strains Are More Equal Than Others // Eur. Urol. 2014, 66(4), Pp. 689–691.
177. Nott T.J., Kelly G., Stach L., Li J., Westcott S., Patel D., Hunt D.M., Howell S., Buxton R.S., O'Hare H.M., Smerdon S.J. An intramolecular switch regulates phosphoindependent FHA domain interactions in Mycobacterium tuberculosis. // Sci. Signal. 2009, 2(63), Pp. ra12.
178. O'Hare H.M., Durán R., Cerveñansky C., Bellinzoni M., Wehenkel A.M., Pritsch O., Obal G., Baumgartner J., Vialaret J., Johnsson K., Alzari P.M. Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. // Mol. Microbiol. 2008, 70(6), Pp. 1408–23.
179. Österberg S., Peso-Santos T. del, Shingler V. Regulation of Alternative Sigma

Factor Use // Annu. Rev. Microbiol. 2011, 65(1), Pp. 37–55.
180. Page R., Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence // Nat. Chem. Biol. 2016, 12(4), Pp. 208–214.
181. Panaretou B., Siligardi G., Meyer P., Maloney A., Sullivan J.K., Singh S., Millson S.H., Clarke P.A., Naaby-Hansen S., Stein R., Cramer R., Mollapour M., Workman P., Piper P.W., Pearl L.H., Prodromou C. Activation of the ATPase activity of Hsp90 by the stress-regulated cochaperone Aha1 // Mol. Cell. 2002, 10(6), Pp. 1307–1318.
182. Perry J.A., Westman E.L., Wright G.D. The antibiotic resistome: What's new? // Curr. Opin. Microbiol. 2014, 21, Pp. 45–20.
183. Pestova E., Millichap J.J., Noskin G.A., Peterson L.R. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. // J. Antimicrob. Chemother. 2000, 45(5), Pp. 583–90.
184. Pfyffer G.E., Welscher H.M., Kissling P., Cieslak C., Casal M.J., Gutierrez J., Rüsch-Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. // J. Clin. Microbiol. 1997, 35(2), Pp. 364–8.
185. Prozorov A.A., Fedorova I.A., Bekker O.B., Danilenko V.N. The virulence factors of Mycobacterium tuberculosis: Genetic control, new conceptions // Russ. J. Genet. 2014, 50(8), Pp. 775–797.
186. Pym A.S., Diacon A.H., Tang S.-J., Conradie F., Danilovits M., Chuchottaworn C., Vasilyeva I., Andries K., Bakare N., Marez T. De, Haxaire-Theeuwes M., Lounis N., Meyvisch P., Baelen B. Van, Heeswijk R.P.G. van, Dannemann B., TMC207-C209 Study Group. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. // Eur. Respir. J. 2016, 47(2), Pp. 564–74.
187. Quinting B., Reyrat J.M., Monnaie D., Amicosante G., Pelicic V., Gicquel B., Frère J.M., Galleni M. Contribution of beta-lactamase production to the resistance of mycobacteria to beta-lactam antibiotics. // FEBS Lett. 1997, 406(3), Pp. 275–8.
188. Raghunand T.R., Bishai W.R. Mycobacterium smegmatis whmD and its

homologue Mycobacterium tuberculosis whiB2 are functionally equivalent. // Microbiology. 2006a, 152(Pt 9), Pp. 2735–47.

189. Raghunand T.R., Bishai W.R. Mapping essential domains of Mycobacterium smegmatis WhmD: insights into WhiB structure and function. // J. Bacteriol. 2006b, 188(19), Pp. 6966–76.

190. Ralph A.P., Kelly P.M., Anstey N.M. L-arginine and vitamin D: novel adjunctive immunotherapies in tuberculosis. // Trends Microbiol. 2008, 16(7), Pp. 336–44.

191. Ramón-García S., Mick V., Dainese E., Martín C., Thompson C.J., Rossi E. De, Manganelli R., Aínsa J.A. Functional and genetic characterization of the tap efflux pump in Mycobacterium bovis BCG // Antimicrob. Agents Chemother. 2012, 56(4), Pp. 2074–2083.

192. Ramón-García S., Ng C., Jensen P.R., Dosanjh M., Burian J., Morris R.P., Folcher M., Eltis L.D., Grzesiek S., Nguyen L., Thompson C.J. WhiB7, an Fe-S-dependent transcription factor that activates species-specific repertoires of drug resistance determinants in actinobacteria // J. Biol. Chem. 2013, 288(48), Pp. 34514–34528.

193. Ramos J.L., Martínez-Bueno M., Molina-Henares A.J., Terán W., Watanabe K., Zhang X., Gallegos M.T., Brennan R., Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005, 69(2), Pp. 326–56.

194. Reeves A.Z., Campbell P.J., Sultana R., Malik S., Murray M., Plikaytis B.B., Shinnick T.M., Posey J.E. Aminoglycoside cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis due to mutations in the 5’ untranslated region of whiB7 // Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57(4), Pp. 1857–1865.

195. Robson J., McKenzie J.L., Cursons R., Cook G.M., Arcus V.L. The vapBC Operon from Mycobacterium smegmatis Is An Autoregulated Toxin–Antitoxin Module That Controls Growth via Inhibition of Translation // J. Mol. Biol. 2009, 390(3), Pp. 353–367.

196. Rüsch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M., Chadwick M., Siddiqi S. Multicenter

laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials. // J. Clin. Microbiol. 2006, 44(3), Pp. 688–92.
197. Rustad T.R., Harrell M.I., Liao R., Sherman D.R. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. // PLoS One. 2008, 3(1), Pp. e1502.
198. Saini V., Farhana A., Steyn A.J.C. WhiB3: A Novel Iron–Sulfur Cluster Protein That Regulates Redox Homeostasis and Virulence // Antioxid. Redox Signal. 2012, 16(7), Pp. 687–697.
199. Sala C., Haouz A., Saul F.A., Miras I., Rosenkrands I., Alzari P.M., Cole S.T. Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from Mycobacterium tuberculosis. // Mol. Microbiol. 2009, 71(5), Pp. 1102–16.
200. Salgame P., Geadas C., Collins L., Jones-López E., Ellner J.J. Latent tuberculosis infection – Revisiting and revising concepts // Tuberculosis. 2015, 95(4), Pp. 373–384.
201. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press. , 1989. 931–957 с.
202. Sander P., Rossi E. De, Böddinghaus B., Cantoni R., Branzoni M., Böttger E.C., Takiff H., Rodriquez R., Lopez G., Riccardi G. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance // FEMS Microbiol. Lett. 2000, 193(1), Pp. 19–23.
203. Scarparo C., Ricordi P., Ruggiero G., Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. // J. Clin. Microbiol. 2004, 42(3), Pp. 1109–14.
204. Scorpio A., Zhang Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. // Nat. Med. 1996, 2(6), Pp. 662–7.
205. Segala E., Sougakoff W., Nevejans-Chauffour A., Jarlier V., Petrella S. New

mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-Ring structure // Antimicrob. Agents Chemother. 2012, 56(5), Pp. 2326–2334.

206. Seng P., Rolain J.-M., Fournier P.E., Scola B. La, Drancourt M., Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. // Future Microbiol. 2010, 5(11), Pp. 1733–54.

207. Shakarchi F.I. Ocular tuberculosis: current perspectives. // Clin. Ophthalmol. 2015, 9, Pp. 2223–7.

208. Sherman D.R., Mdluli K., Hickey M.J., Arain T.M., Morris S.L., Barry C.E., Stover C.K. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. // Science. 1996, 272(5268), Pp. 1641–3.

209. Shi W., Zhang X., Jiang X., Yuan H., Lee J.S., Barry C.E., Wang H., Zhang W., Zhang Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. // Science. 2011, 333(6049), Pp. 1630–2.

210. Singh A., Crossman D.K., Mai D., Guidry L., Voskuil M.I., Renfrow M.B., Steyn A.J.C. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. // PLoS Pathog. 2009, 5(8), Pp. e1000545.

211. Singh A., Guidry L., Narasimhulu K. V, Mai D., Trombley J., Redding K.E., Giles G.I., Lancaster J.R., Steyn A.J.C. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to O2 and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007, 104(28), Pp. 11562–7.

212. Singh A., Gupta R., Vishwakarma R.A., Narayanan P.R., Paramasivan C.N., Ramanathan V.D., Tyagi A.K. Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of Mycobacterium tuberculosis in the spleens of guinea pigs. // J. Bacteriol. 2005, 187(12), Pp. 4173–86.

213. Singh A., Jain S., Gupta S., Das T., Tyagi A.K. mymA operon of Mycobacterium tuberculosis: its regulation and importance in the cell envelope. // FEMS Microbiol. Lett. 2003, 227(1), Pp. 53–63.

214. Singh B., Mitchison D.A. Bactericidal activity of streptomycin and isoniazid against tubercle bacilli. // Br. Med. J. 1954, 1(4854), Pp. 130–2.
215. Singh R., Barry C.E., Boshoff H.I.M. The three RelE homologs of Mycobacterium tuberculosis have individual, drug-specific effects on bacterial antibiotic tolerance. // J. Bacteriol. 2010, 192(5), Pp. 1279–91.
216. Smith L.J., Stapleton M.R., Fullstone G.J.M., Crack J.C., Thomson A.J., Brun N.E. Le, Hunt D.M., Harvey E., Adinolfi S., Buxton R.S., Green J. Mycobacterium tuberculosis WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide-sensitive iron-sulfur cluster. // Biochem. J. 2010, 432(3), Pp. 417–27.
217. Solans L., Aguiló N., Samper S., Pawlik A., Frigui W., Martín C., Brosch R., Gonzalo-Asensio J. A specific polymorphism in Mycobacterium tuberculosis H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. // Infect. Immun. 2014, 82(8), Pp. 3446–56.
218. Soliveri J.A., Gomez J., Bishai W.R., Chater K.F. Multiple paralogous genes related to the Streptomyces coelicolor developmental regulatory gene whiB are present in Streptomyces and other actinomycetes. // Microbiology. 2000, Pp. 333–43.
219. Soolingen D. Van, Hoogenboezem T., Haas P.E.W. De, Hermans P.W.M., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M., Embden J.D.A. Van. A Novel Pathogenic Taxon of the Mycobacterium tuberculosis Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997, 47(4), Pp. 1236–1245.
220. Soolingen D. van, Qian L., Haas P.E. de, Douglas J.T., Traore H., Portaels F., Qing H.Z., Enkhsaikan D., Nymadawa P., Embden J.D. van. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. // J. Clin. Microbiol. 1995, 33(12), Pp. 3234–8.
221. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Williams D.L., Kreiswirth B.N., Musser J.M. Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse geographic localities. //

Antimicrob. Agents Chemother. 1996, 40(4), Pp. 1024–6.
222. Stapleton M.R., Smith L.J., Hunt D.M., Buxton R.S., Green J. Mycobacterium tuberculosis WhiB1 represses transcription of the essential chaperonin GroEL2. // Tuberculosis (Edinb). 2012, 92(4), Pp. 328–32.
223. Steingart K.R., Henry M., Ng V., Hopewell P.C., Ramsay A., Cunningham J., Urbanczik R., Perkins M., Aziz M.A., Pai M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. // Lancet. Infect. Dis. 2006, 6(9), Pp. 570–81.
224. Steingart K.R., Schiller I., Horne D.J., Pai M., Boehme C.C., Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults // Cochrane Database of Systematic Reviews / под ред. K.R. Steingart. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. C. CD009593.
225. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsch-Gerdes S., Willery E., Savine E., Haas P. de, Deutekom H. van, Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. // J. Clin. Microbiol. 2006, 44(12), Pp. 4498–510.
226. Takiff H.E., Salazar L., Guerrero C., Philipp W., Huang W.M., Kreiswirth B., Cole S.T., Jacobs W.R., Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. // Antimicrob. Agents Chemother. 1994, 38(4), Pp. 773–80.
227. Tao J., Han J., Wu H., Hu X., Deng J., Fleming J., Maxwell A., Bi L., Mi K. Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance // Nucleic Acids Res. 2013, 41(4), Pp. 2370–2381.
228. Thabet S., Souissi N. Transposition mechanism, molecular characterization and evolution of IS6110, the specific evolutionary marker of Mycobacterium tuberculosis complex // Mol. Biol. Rep. 2016.

229. Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B., Guesdon J.L. IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex. // Nucleic Acids Res. 1990, 18(1), Pp. 188.
230. Thimmappa D., Mallikarjuna M.N., Vijayakumar A. Breast Tuberculosis. // Indian J. Surg. 2015, 77(Suppl 3), Pp. 1378–84.
231. Tian J., Bryk R., Itoh M., Suematsu M., Nathan C. Variant tricarboxylic acid cycle in Mycobacterium tuberculosis: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005, 102(30), Pp. 10670–5.
232. Tremblay L.W., Fan F., Blanchard J.S. Biochemical and structural characterization of Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem. // Biochemistry. 2010, 49(17), Pp. 3766–73.
233. Unoson C., Wagner E.G.H. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in Escherichia coli // Mol. Microbiol. 2008, 70(1), Pp. 258–270.
234. Vilchèze C., Av-Gay Y., Attarian R., Liu Z., Hazbón M.H., Colangeli R., Chen B., Liu W., Alland D., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. // Mol. Microbiol. 2008, 69(5), Pp. 1316–29.
235. Vilchèze C., Wang F., Arai M., Hazbón M.H., Colangeli R., Kremer L., Weisbrod T.R., Alland D., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Transfer of a point mutation in Mycobacterium tuberculosis inhA resolves the target of isoniazid. // Nat. Med. 2006, 12(9), Pp. 1027–1029.
236. Viveiros M., Martins M., Rodrigues L., Machado D., Couto I., Ainsa J., Amaral L. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs // Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2012, 10(9), Pp. 983–998.
237. Voladri R.K., Lakey D.L., Hennigan S.H., Menzies B.E., Edwards K.M., Kernodle D.S. Recombinant expression and characterization of the major beta-lactamase of Mycobacterium tuberculosis. // Antimicrob. Agents Chemother. 1998, 42(6), Pp. 1375–81.
238. Walburger A., Koul A., Ferrari G., Nguyen L., Prescianotto-Baschong C.,

Huygen K., Klebl B., Thompson C., Bacher G., Pieters J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. // Science. 2004, 304(5678), Pp. 1800–4.

239. Walter N.D., Dolganov G.M., Garcia B.J., Worodria W., Andama A., Musisi E., Ayakaka I., Van T.T., Voskuil M.I., Jong B.C. De, Davidson R.M., Fingerlin T.E., Kechris K., Palmer C., Nahid P., Daley C.L., Geraci M., Huang L., Cattamanchi A., et al. Transcriptional Adaptation of Drug-tolerant Mycobacterium tuberculosis During Treatment of Human Tuberculosis // Journal of Infectious Diseases. , 2015. C. 990–998.

240. Walters S.B., Dubnau E., Kolesnikova I., Laval F., Daffe M., Smith I. The Mycobacterium tuberculosis PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis // Mol. Microbiol. 2006, 60(2), Pp. 312–330.

241. Wang F., Cassidy C., Sacchettini J.C. Crystal structure and activity studies of the Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase reveal its critical role in resistance to beta-lactam antibiotics. // Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 50(8), Pp. 2762–71.

242. Watt B., Edwards J.R., Rayner A., Grindey A.J., Harris G. In vitro activity of meropenem and imipenem against mycobacteria: development of a daily antibiotic dosing schedule // Tuber. Lung Dis. 1992, 73(3), Pp. 134–136.

243. Wattal C., Goel N., Prasad K., Raveendran R., Oberoi J., Datta S. Utility of GenoType MTBDRplus assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India // Indian J. Med. Microbiol. 2012, 30(1), Pp. 58.

244. Wei J., Dahl J.L., Moulder J.W., Roberts E.A., O'Gaora P., Young D.B., Friedman R.L. Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene that enhances mycobacterial survival in macrophages. // J. Bacteriol. 2000, 182(2), Pp. 377–84.

245. Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Niemann S., Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. // Nucleic Acids Res. 2010, 38(Web Server issue), Pp. W326-31.

246. WHO. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection.

247. Williams A., James B.W., Bacon J., Hatch K.A., Hatch G.J., Hall G.A., Marsh P.D. An assay to compare the infectivity of Mycobacterium tuberculosis isolates based on aerosol infection of guinea pigs and assessment of bacteriology // Tuberculosis. 2005, 85(3), Pp. 177–184.

248. Wolff K.A., la Peña A.H. de, Nguyen H.T., Pham T.H., Amzel L.M., Gabelli S.B., Nguyen L. A redox regulatory system critical for mycobacterial survival in macrophages and biofilm development. // PLoS Pathog. 2015, 11(4), Pp. e1004839.

249. Wolff K.A., Nguyen H.T., Cartabuke R.H., Singh A., Ogwang S., Nguyen L. Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria. // Antimicrob. Agents Chemother. 2009, 53(8), Pp. 3515–9.

250. Wong S.Y., Lee J.S., Kwak H.K., Via L.E., Boshoff H.I.M., Barry C.E. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Antimicrob. Agents Chemother. 2011, 55(6), Pp. 2515–22.

251. World Health Organization. Recommendations for investigating contacts of persons with infectious tuberculosis in low- and middle-income countries // World Heal. Organ. 2012, Pp. 28–41.

252. Worthington R.J., Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria // Trends Biotechnol. 2013, 31, Pp. 179–186.

253. Wright G.D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance // Trends Microbiol. 2016, 24(11), Pp. 862–871.

254. Yamaguchi Y., Park J.-H., Inouye M. Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea // Annu. Rev. Genet. 2011, 45(1), Pp. 61–79.

255. Yaseen I., Kaur P., Nandicoori V.K., Khosla S. Mycobacteria modulate host epigenetic machinery by Rv1988 methylation of a non-tail arginine of histone H3. // Nat. Commun. 2015, 6, Pp. 8922.

256. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. // BMC Bioinformatics. 2012, 13, Pp. 134.

257. Zaunbrecher M.A., Sikes R.D., Metchock B., Shinnick T.M., Posey J.E.

Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009, 106(47), Pp. 20004–9.

258. Zaychikova M. V., Zakharevich N. V., Sagaidak M.O., Bogolubova N.A., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Alekseeva M.G., Chernousova L.N., Danilenko V.N. Mycobacterium tuberculosis Type II Toxin-Antitoxin Systems: Genetic Polymorphisms and Functional Properties and the Possibility of Their Use for Genotyping. // PLoS One. 2015, 10(12), Pp. e0143682.

259. Zhang S., Chen J., Shi W., Liu W., Zhang W., Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Emerg. Microbes Infect. 2013, 2(6), Pp. e34.

260. Zhang Y., Dhandayuthapani S., Deretic V. Molecular basis for the exquisite sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996, 93(23), Pp. 13212–6.

261. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S. The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis // Nature. 1992a, 358(6387), Pp. 591–593.

262. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. // Nature. 1992b, 358(6387), Pp. 591–3.

263. WHO. Geneva, Switzerland: , 2015. 1689-1699 с.

Приложение

Приложение А

Таблица 1. Антибиотики, использованные в работе.

Название	Концентрация мкг /диск	Химический класс антибиотика
Меропенем	10	β-лактамные антибиотики
Имипенем	10	
Тетрациклин	30	тетрациклиновая группа
Окситетрациклин	30	
Телитромицин	15	макролиды
Спирамицин	100	
Рокситромицин	5	
Эритромицин	15	
Кларитромицин	5	
Азитромицин	15	
Линкомицин	10	линкозамиды
Клиндамицин	10	
Спарфлоксацин	5	фторхинолоны
Офлоксацин	5	
Норфлоксацин	10	
Моксифлоксацин	5	
Ломефлоксацин	10	
Левофлоксацин	5	
Гатифлоксацин	5	
Ципрофлоксацин	1	
Стрептомицин	10	аминогликозиды
Тобрамицин	10	
Сизомицин	10	

Нетилмицин	10	
Неомицин	5	
Канамицин	30	
Изепамицин	30	
Гентамицин	10	
Амикацин	30	
Рифампицин	100	другие
Линезолид	10	
Фузидиновая кислота	10	
Хлорамфеникол	30	

Таблица 2. Гены резистома *M. tuberculosis* и их ортологи в *M. smegmatis*

№	Локус в *M. tuberculosis* H37Rv	Название гена в *M. tuberculosis* H37Rv/функция	Локус гена-ортолога в *M. smegmatis* mc^2 155	Название гена в *M. smegmatis* mc^2 155
1	Rv3219	*whiB1*	MSMEG_1919	transcription factor WhiB
2	Rv3260c	*whiB2*	MSMEG_1831	transcription factor WhiB
3	Rv3416	*whiB3*	MSMEG_1597	transcription factor WhiB
4	Rv3681c	*whiB4*	MSMEG_6199	transcription factor WhiB
5	Rv0022c	*whiB5*		
6	Rv3862c	*whiB6*	MSMEG_0051	transcription factor WhiB family protein
7	Rv3197A	*whiB7*	MSMEG_1953	*whiB7*
8	Rv1258c	*tap*	MSMEG_5033	pseudo
9	Rv2416c	*eis*	MSMEG_3513	hypothetical protein
10	Rv1988	*erm(37)*	MSMEG_1646	*erm38*
11	Rv0263c	hypothetical protein	MSMEG_0435	allophanate hydrolase subunit 2
12	Rv3168	aminoglycoside phosphotransferase	MSMEG_2042	phosphotransferase enzyme family protein
13	Rv3225c	GCN5-like N-acetyltransferase		
14	Rv3817	phosphotransferase		
15	Rv2004c	hypothetical protein	MSMEG_3942	hypothetical protein
16	Rv3205c	hypothetical protein	MSMEG_1938	hypothetical protein
17			MSMEG_0270	aminoglycoside phosphotransferase

18			MSMEG_1006	aminoglycoside phosphotransferase
19			MSMEG_2286	aminoglycoside phosphotransferase
20			MSMEG_4827	aminoglycoside phosphotransferase
21			MSMEG_5437	serine/threonine protein kinase
22			MSMEG_6129	hypothetical protein
23			MSMEG_6127	anti-anti-sigma factor
24			MSMEG_6225	proton antiporter efflux pump
25			MSMEG_6223	
26	Rv0849	MFS-type transporter		
27	Rv1217c	tetronasin ABC transporter integral membrane protein		
28	Rv1218c	tetronasin ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_5074	transcriptional regulatory protein
29	Rv1667c\1668	pseudo	MSMEG_3768	macrolide ABC transporter ATP-binding protein
30	Rv1273c	drug ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_5008	ABC transporter ATP-binding protein
31	Rv1272c	drug ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_5009	ABC transporter
32	Rv1348	ron ABC transporter ATP-binding protein/permease IrtA	MSMEG_6553	ABC transporter ATP-binding protein
33	Rv1349	iron ABC transporter ATP-binding protein/permease IrtB	MSMEG_6553	ABC transporter ATP-binding protein
34	Rv0194	multidrug ABC transporter ATPase/permease		
35	Rv1620c	cytochrome biosyntheisis ABC transporter ATP-binding protein/permease CydC	MSMEG_3231	cysteine ABC transporter permease/ATP-binding protein cydD
36	Rv1621c	cytochrome biosyntheisis ABC transporter ATP-binding	cysteine ABC transporter permease/ATP-binding protein cydD	

		protein/permease CydD		
37	Rv3041c	ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_1045, MSMEG_1046, MSMEG_1047	molybdenum ABC transporter ATPase
38	Rv2936	daunorubicin ABC transporter ATP-binding protein DrrA		
39	Rv2937	daunorubicin ABC transporter permease DrrB		
40	Rv2938	daunorubicin ABC transporter permease DrrC		
41	rv1458c	antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_3118	ABC transporter
42	rv1457c	antibiotic ABC transporter permease	MSMEG_3119	ABC transporter
43	rv1456c	antibiotic ABC transporter permease	MSMEG_3120	ABC transporter
44	Rv2686c	antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_1502	ABC transporter ATP-binding protein
45	Rv2687c	antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_1503	ABC transporter ATP-binding protein
46	Rv2688c	antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	MSMEG_1504	ABC transporter ATP-binding protein
47	Rv1410c	aminoglycosides/tetracycline-transport integral membrane protein	MSMEG_3069	aminoglycosides/tetracycline-transport integral membrane protein
48	Rv1634	multidrug-efflux transporter	MSMEG_3815	drug efflux membrane protein
49	Rv2846c	MFS-type transporter EfpA	MSMEG_2619	efflux protein
50	Rv3065	multidrug resistance protein Mmr		
51	Rv2942	transmembrane transport protein MmpL7		
52	Rv0820	phosphate ABC transporter ATP-binding protein PhoT	MSMEG_5779	phosphate ABC transporter ATP-binding protein pstB
53	Rv1250	MFS-type drug transporter	MSMEG_5046	drug transporter
54	Rv2994	MFS-type transporter	MSMEG_2380	sugar transporter family protein

55	Rv2333c	multidrug resistance protein stp		
56	Rv2459	MFS-type transporter		
57	Rv0933	hosphate ABC transporter ATP-binding protein PstB		
58	Rv0678	hypothetical protein		

фиолетовым – *whiB-like* гены, желтым цветом выделены гены АРН.

Таблица 3. Гены вирулентности, толерантности, природной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

Группа, колличество генов	**Гены**
Белки клеточной стенки, 48	erp-pirG(rv3810), fbpA(rv3804c), mce1R(rv0165c), yrbE1A(rv0167), yrbE1B(rv0168), mce1A(rv0169), mce1B(rv0170), mce1C(rv0171), mce1D(rv0172), mce1E(rv0173), mce1F(rv0174), mce2R(rv0586), yrbE2A(rv0587), yrbE2B(rv0588), mce2A(rv0589), mce2B(rv0590), mce2C(rv0591), mce2D(rv0592), lprL(rv0593), mce2F(rv0594), mce3R(rv1963c), yrbE3A(rv1964), yrbE3B(rv1965), mce3A(rv1966), mce3B(rv1967), mce3C(rv1968), mce3D(rv1969), lprM(rv1970), mce3F(rv1971), yrbE4A(rv3501c), yrbE4B(rv3500c), mce4A(rv3499c), mce4B(rv3498c), mce4C(rv3497c), mce4D(rv3496c), lprN(rv3495c), mce4F(rv3494c), ompATb(rv0899), hbhA(rv0475), pstA1(rv0930), phoT(rv0820), caeA(rv2224c), kefB(rv3236c), dppA(rv3666c), dppB(rv3665c), dppC(rv3664c), dppD(rv3663c), ctaC(rv2200c)
Липопротеины, 7	lppX(rv2945c), lpqH(rv3763), lprG(rv1411c), p55(rv1410c), pstS-1(rv0934), lpqY(rv1235), modA(rv1857)
Метаболизм жирных кислот, 17	pks15(rv2947c), pks1(rv2946c), pks10(rv1660), fadD26(rv2930), fadD28(rv2941), mmpL7(rv2942), drrC(rv2938), pks5(rv1527c), pks7(rv1661), mmpL8(rv3823c), fadD33-mbtM(rv1345), icl1(rv0467), aceAa(rv1915), aceAb(rv1916), plcA(rv2351c), plcB(rv2350c), plcC(rv2349c)
Синтез миколовых кислот, 12	kasB(rv2246), mmaA4(rv0642c), pcaA(rv0470c), rv3083(rv3083), lipR(rv3084), rv3085(rv3085), adhD(rv3086), rv3087(rv3087), tgs4(rv3088), fadD13(rv3089), rv2869c(rv2869c), treS(rv0126)
Катаболизм холестерола, 6	choD(rv3409c), hsaC(rv3568c), cyp125(rv3545c), fadE28(rv3544c), fadE29(rv3543c), ltp2(rv3540c)

Система секреции VII типа, 17	esxA(rv3875), eccA1(rv3868), eccB1(rv3869), eccCa(rv3870), eccCb1(rv3871), esxB(rv3874), espH(rv3867), espG1(rv3866), espA(rv3616c), espC(rv3615c), eccD1(rv3877), espD(rv3614c), espR(rv3849), mycP1(rv3883c), eccD5(rv1795), lspA(rv1539), secA2(rv1821)
Ингибиторы ответа макрофага, 15	hspX(rv2031c), acr2(rv2051c), rv2136c(rv2136c), ponA2(rv3682), ahpC(rv2428), sodC(rv0432), mel2-1(rv1936), mel2-2(rv1937), mel2-ephB(rv1938), mel2-3(rv1939), katG(rv1908c), tpX(rv1932), ndkA(rv2445c), ptpA(rv2234), nuoG(rv3151)
Сигма факторы, 8	sigA(rv2703), sigC(rv2069), sigD(rv3414c), sigE(rv1221), sigF(rv3286c), sigG(rv0182c), sigH(rv3223c), sigL(rv0735)
Двухкомпонентные системы, 12	phoP(rv0757), phoR(rv0758), aprA(rv2395A), aprB(rv2395B), aprC(rv2396), senX3(rv0490), regX3(rv0491), dosS-devS(rv3132c), dosT(rv2027c), dosR-devR(rv3133c), mprA(rv0981), mprB(rv0982)
СТПК, 3	pknD(rv0931c), pknE(rv1743), pknG(rv0410c)
ТА, 142	Novel1(rv1546), Novel1-2(rv1545), Novel2(rv2653c), Novel2-2(rv2654c), Novel3(rv0910), Novel3-2(rv0909), mazF1(rv0456A), mazE1(rv0456B), mazF2(rv0659c), mazE2(rv0660c), mazF3(rv1102c), mazE3(rv1103c), mazF4(rv1495), mazE4(rv1494), mazF5(rv1942c), mazE5(rv1943c), mazF6(rv1991c), mazE6(rv1991A), mazF7(rv2063A), mazE7(rv2063), mazF8(rv2274c), mazE8(rv2274A), mazF9(rv2801c), mazE9(rv2801A), mazF10(rv0299), mazE10(rv0298), relE1(rv1246c), relB1(rv1247c), relG-relE2(rv2866), relF-relB2(rv2865), relK-relE3(rv3358), relJ-relB3(rv3357), parE1(rv1959c), parD1(rv1960c), parE2(rv2142c), parD2(rv2142A), higB1(rv1955), higA1(rv1956), higB2(rv2022c), higA2(rv2021c), higB3(rv3182), higA3(rv3183), vapC1(rv0065), vapB1(rv0064A), vapC2(rv0301), vapB2(rv0300), vapC3(rv0549c), vapB3(rv0550c), vapC4(rv0595c), vapB4(rv0596c), vapC5(rv0627), vapB5(rv0626), vapC6(rv0656c), vapB6(rv0657c), vapC7(rv0661c), vapB7(rv0662c), vapC8(rv0665), vapB8(rv0664), vapC9(rv0960), vapB9(rv0959A), vapC10(rv1397c), vapB10(rv1398c), vapC11(rv1561), vapB11(rv1560), vapC12(rv1720c), vapB12(rv1721c), vapC13(rv1838c), vapB13(rv1839c), vapC14(rv1953), vapB14(rv1952), vapC15(rv2010), vapB15(rv2009), vapC16(rv2231A), vapB16(rv2231B), vapC17(rv2527), vapB17(rv2526), vapC18(rv2546), vapB18(rv2545),

	vapC19(rv2548), vapB19(rv2547), vapC20(rv2549c), vapB20(rv2550c), vapC21(rv2757c), vapB21(rv2758c), vapC22(rv2829c), vapB22(rv2830c), vapC23(rv2863), vapB23(rv2862A), vapC24(rv0240), vapB24(rv0239), vapC25(rv0277c), vapB25(rv0277A), vapC26(rv0582), vapB26(rv0581), vapC27(rv0598c), vapB27(rv0599c), vapC28(rv0609), vapB28(rv0608), vapC29(rv0617), vapB29(rv0616A), vapC30(rv0624), vapB30(rv0623), vapC31(rv0749), vapB31(rv0748), vapC32(rv1114), vapB32(rv1113), vapC33(rv1242), vapB33(rv1241), vapC34(rv1741), vapB34(rv1740), vapC35(rv1962c), vapB35(rv1962A), vapC36(rv1982c), vapB36(rv1982A), vapC37(rv2103c), vapB37(rv2104c), vapC38(rv2494), vapB38(rv2493), vapC39(rv2530c), vapB39(rv2530A), vapC40(rv2596), vapB40(rv2595), vapC41(rv2602), vapB41(rv2601A), vapC42(rv2759c), vapB42(rv2760c), vapC43(rv2872), vapB43(rv2871), vapC44(rv3320c), vapB44(rv3321c), vapC45(rv2019), vapB45(rv2018), vapC46(rv3384c), vapB46(rv3385c), vapC47(rv3408), vapB47(rv3407), vapC48(rv3697c), vapB48(rv3697A), vapC49(rv3180c), vapB49(rv3181c), vapC50(rv3749c), vapB50(rv3750c)
Протеазы, 7	pepD(rv0983), rv3671c(rv3671c), clgR(rv2745c), zmp1(rv0198c), rip(rv2869c), pafA(rv2097c), mpa(rv2115c)
Белки транспорта металлов, 7	mbtB(rv2383c), irtA(rv1348), irtB(rv1349), ideR(rv2711), mgtC(rv1811), ctpC(rv3270), ctpV(rv0969)
Другие, 18	hspR(rv0353), whiB3(rv3416), mosR(rv0348), virS(rv3082c), phoY2(rv0821c), mmpl4(rv0450c), rv1979c(rv1979c), mpt64(rv1980c), nrdF1(rv1981c), acg(rv2032), pckA(rv0211), hsp22.5(rv0990c), ptpB(rv0153c), sapM(rv3310), eis(rv2416c), erm(37)(rv1988), tap(rv1258c), whiB7(rv3197A)

Приложение Б

```
Tap        MRNSNRGPAFLILFATLMAAAGDGVSIVAFPWLVLQREGSAGQASIVASATMLPLLFATL
MSMEG_5033  MITTRSGPLLLILFAALMAGAGNGISIVAFPWLVLQRNGSAVDASIVAMAGTLPLLVATL

Tap        VAGTAVDYFGRRRVSMVADALSGAAVAGVPLVAWGYGGDAVNVLVLAVLAALAAAFGPAG
MSMEG_5033  IAGAAVDYLGRRGRSTSRCSRCSPLSVR-SSIRRGSTOP---------------------

Tap        MTARDSMLPEAAARAGWSLDRINGAYEAILNLAFIVGPAIGGLMIATVGGITTMWITATA
MSMEG_5033  ------------------------------------------------------------

Tap        FGLSILAIAALQLEGAGKPHHTSRPQGLVSGIAEGLRFVWNLRVLRTLGMIDLTVTALYL
MSMEG_5033  ------------------------------------------------------------

Tap        PMESVLFPKYFTDHQQPVQLGWALMAIAGGGLVGALGYAVLAIRVPRRVTMSTAVLTLGL
MSMEG_5033  ------------------------------------------------------------

Tap        ASMVIAFLPPLPVIMVLCAVVGLVYGPIQPIYNYVIQTRAAQHLRGRVVGVMTSLAYAAG
MSMEG_5033  ------------------------------------------------------------

Tap        PLGLLLAGPLTDAAGLHATFLALALPIVCTGLVAIRLPALRELDLAPQADIDRPVGSAQ
MSMEG_5033  ------------------------------------------------------------
```

Рисунок 1. Выравнивание аминокислотной последовательности белка Tap *M. tuberculosis* H37Rv и его ортолога у *M. smegmatis* mc^{2}155 - *MSMEG_5033*. Красным цветом выделено место образования стоп-кодона.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Праймеры для проведения секвенирования ДНК *M. tuberculosis*			
Номер	**Название**	**5’-3’ последовательность**	**Ампликон**
1	WB7sF	GCG-CGC-GAC-ACG-AGA-GGA	*whiB7*
2	WB7sR	ATC-GGT-GGG-CGC-GAT-CCT	
3	Rv1258-1F	GAA-GGC-ACG-GCG-CTT-GAC-GAC	*tap*
4	Rv1258-1R	CGC-GAT-CAT-CAA-GCC-ACC-GAT	
5	Rv1258-2F	ATG-ACG-GCT-CGT-GAC-TCG-ATG-CT	
6	Rv1258-2R	CGA-CCA-GCC-CGG-TGC-ACA-CGA-TG	
7	Rv1258-3F	TCG-GCC-TGG-TGT-ACG-GAC-CCA-TC	
8	Rv1258-3R	AAG-GGT-CAA-AGG-CCC-GGT-CTT-GC	
9	Rv1473-1F	CGC-GTC-TTC-TTT-GAC-TTC-CGC-AT	*rv1473*
10	Rv1473-1R	GAT-CGG-ATG-ATG-GCC-GCA-CTC-GAC	
11	Rv1473-2F	ACT-TCC-AGC-GAG-CCA-TAC-GTC-T	
12	Rv1473-2R	CCC-AAA-GTT-GGC-GAT-CTC-GAC-GTG	
13	Rv1473-3F	CGA-CCT-CGG-CCA-TCA-ACG-CCT-G	
14	Rv1473-3R	CGA-ATT-GGG-GCT-GAG-CTA-CCT-GT	
Праймеры для проведения сайт-направленного мутагенеза *whiB7*			
Номер	**Название**	**5’-3’ последовательность**	**Ампликон**
1	whiB7Mt_dir	TTT-TGA-ATT-CAT-GAG-CGT-GCT-GAC-C	*whiB7*ΔG_{191}
2	whiB7Mt_mixdir	AAC-GCG-CCG-AGC-CGT-GGG-CGT-TTG-GGG-TGG-TGA	

3	whiB7Mt_mixrev	TTT-TAA-GCT-TGA-CTC-ACG-ATC-GAG-C	
4	whiB7Mt_mix-	TCA-CCA-CCC-CAA-ACG-CCC-ACG-GCT-CGG-CGC-GTT	
Праймеры для клонирования			
Номер	**Название**	**5’-3’ последовательность**	**Ампликон**
1	pM-wb7-f	GAC-AGG-ATC-CGG-AGG-AAA-TGT-TAT-GAG-CGT-GCT-GAC-CGT-TCC	*whiB7* и *whiB7*ΔG_{191}
2	pM-wb7-r	ATG-CAC-TAG-TTT-ACG-CCA-CGG-CAT-CTT-TAC-GCG	
3	pM-wb7M-r	ATG-CAC-TAG-TTT-AGA-CTC-ACG-ATC-GAG-CCT-TGG-T	
4	PM1258_F	GAC-AGG-ATC-CGG-AGG-AAA-TGT-TAT-GAG-AAA-CAG-CAA-CCG-CGG	*tap* и *tap*(insC_{581})
5	PM1258_R	ATG-CAC-TAG-TTT-ATC-ACT-GAG-CCG-ATC-CTA-CGG-G	
6	Rv1473_pM-F	GAC-AGA-TAT-CGG-AGG-AAA-TGT-TGT-GAT-CAC-AGC-TAC-GGA-CCT	*rv1473*
7	Rv1473_pM-R	ATG-CAC-TAG-TTT-ATC-AGG-CCA-GCT-CGA-TGA-GAT	
Праймеры для проведения ПЦР в реальном времени			
Номер	**Название**	**5’-3’ последовательность**	**Ампликон**
1	whiB7	CAT-GTC-GGT-GAC-CCG-GAT-CTG-T	whiB7
2	whiB7Rev	ACA-ATG-CTT-CCG-CGG-TCG-AG	
3	napM	GCG-TTC-TCC-TAC-GGT-TCG-CTC-TAT-C	napM
4	napMRev	GAA-GCC-GTC-GTC-GGA-GTA-GTT-CTG	
5	BlaS	GGA-ACA-ACG-CAT-CCA-TCG-GCA-TCT-A	BlaS
6	BlaSRev	GCG-GGA-TCC-ACG-AAG-ACA-CGA-T	
7	LtmA	ACG-AGA-AAT-AGG-TGT-AGG-CGG-TTG-C	LtmA
8	LtmARev	TGT-CCG-ATC-CGG-CCA-TGG-AGT	
9	TetR	GCC-GAT-ACC-GCC-GAT-CTG-TTC-AT	TetR
10	TetRRev	CTT-CGC-CAG-TTC-TGC-GTTCGAAAT	
11	RbpA	CGAGGAGTTCGACGTACCTTTCGC	RbpA
12	RbpARev	CTTGATCAGGTCGAGACGCTCCTTG	
13	mtrA	GCAAACCACGGCAGGTGTTTACTC	mtrA
14	mtrARev	TTGTATCCCACTCCTCGAACGGTCA	
15	MfpB	CAGGTTCTGGTTCATGTGGGACGAC	MfpB
16	MfpBRev	ATGACCGGGATGTGCTCGGGTA	
17	LfrR	CCGATCGTGCTGTTCGTCTACTACG	LfrR
18	LfrRRev	CCTCATAACCGGCCTGCATCAGT	
19	MCE1A	GGTGTTCGGCAACAAGTACATCTCGT	MCE1A
20	MCE1ARev	GTCAGGGTCTCGTTGAGCTTGATCG	
21	Mce3B	GCCGACCACGAATACCTCGATAACA	Mce3B
22	Mce3BRev	TCCTGTCACCTGTTCTGCAAGTTTGA	
23	mce3F	CACGGCGCACAAAGGTATGTTCTTG	mce3F
24	mce3FRev	AGGAACGGTTTCGCACGGAATGTTA	
25	MazE	GCCGTTTACGACAAGCGACACC	MazE

26	MazERev	TCGGTCCTGACCATGTCTGTCTCC	
27	doc	TGAAGGTGCGGGACTACGGACT	doc
28	docRev	CGTTGATGTGCAGAAATGTCCATGCC	
29	PilT	GGCTGACGATCCTGTTCGGACTATG	PilT
30	PilTRev	TTGCCGTATCTCCGGTAAGCCAAC	
31	MSMEG_6760	CGATCTGGTTGATGGCCGACGA	MSMEG_6760
32	MSMEG_6760Rev	ATGAACCGCACAGCTTCTCGTTCC	
33	qsigAs-sm-f	CGA-GCT-TGT-TGA-TCA-CCT-CGA-CCA-T	SigA
34	qsigAs-sm-r	CTC-GAC-CTC-ATC-CAG-GAA-GGC-AAC	
35	qPolAs-sm-f	GGT-CTG-GTT-GAA-CGT-CGT-GTG-GAT-G	PolA
36	qPolAs-sm-r	GCT-GGA-GAT-GCC-GAA-GAC-CAA-GAA-G	

Приложение В

Таблица 1. Характеристика клинических изолятов *M. tuberculosis*.

Группа номер	Группа	#	Предшествующее лечение	H*	R*	E*	Z*	Et*	A*	Cp*	Levofloxacin*
Б	Чувствительные	13-4446	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-4220	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-4189	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-4178	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-4050	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-4009	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3935	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3896	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3632	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3629	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3617	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3594	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3582	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3539	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3538	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3537	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3387	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3292	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3158	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3085	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-3055	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-2975	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Б	Чувствительные	13-2566	новый случай	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-1780	новый случай	У	У	У	Ч	У	У	У	У
А	Устойчивые	13-2041	ранее леченный	У	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2078	ранее леченный	У	Ч	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2105	новый случай	У	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2243	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	Ч	У
А	Устойчивые	13-2292	ранее леченный	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2385	новый случай	У	У	У	У	Ч	У	У	Ч
А	Устойчивые	13-2392	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	Ч	Ч

А	Устойчивые	13-2432	новый случай	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2674	новый случай	У	У	У	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2776	ранее леченный	У	У	У	У	У	Ч	Ч	У
А	Устойчивые	13-3134	новый случай	У	У	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3435	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	У	У
А	Устойчивые	13-3636	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	У	BD003
А	Устойчивые	13-3805	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	У	У
А	Устойчивые	13-4064	новый случай	У	Ч	Ч	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-4152	ранее леченный	У	У	Ч	У	У	У	У	Ч
А	Устойчивые	13-4177	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	У	У
А	Устойчивые	13-4223	ранее леченный	У	У	У	Ч	У	Ч	Ч	У
А	Устойчивые	13-4614	новый случай	У	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У
А	Устойчивые	13-1870	ранее леченный	У	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-1871	новый случай	У	У	У	У	У	У	У	Ч
А	Устойчивые	13-1936	новый случай	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-1965	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	У	У
А	Устойчивые	13-2253	новый случай	У	У	У	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2376	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	Ч	У
А	Устойчивые	13-2459	ранее леченный	У	У	У	У	У	У	У	Ч
А	Устойчивые	13-2836	ранее леченный	У	У	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-2864	ранее леченный	У	У	У	У	Ч	У	У	Ч
А	Устойчивые	13-2978	ранее леченный	У	У	У	Ч	У	У	У	Ч
А	Устойчивые	13-3086	новый случай	У	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3114	новый случай	У	Ч	Ч	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3147	новый случай	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3208	новый случай	У	Ч	Ч	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3318	ранее леченный	У	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3373	новый случай	У	Ч	У	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3390	ранее леченный	У	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3742	новый случай	У	У	Ч	У	У	У	Ч	У
А	Устойчивые	13-3917	новый случай	У	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-3918	новый случай	У	У	Ч	Ч	У	Ч	Ч	Ч
А	Устойчивые	13-4781	ранее леченный	У	У	У	У	У	Ч	Ч	Ч

***-** Сокращения антибиотиков (Таблица 1.2)

Таблица 2. Результаты сполиготипирования изолятов *M. tuberulosis* (SpolDB4)

Группа штаммов	№ штамма	Схема сполиготипа	Кластер (SIT)
A	13-1780	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2041	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2078	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2105	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2243	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2292	■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□■■□□□□■■■■■■■■■	Уникальный
	13-2385	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2392	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2432	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2674	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2776	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3134	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3435	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3636	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3805	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4064	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4152	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4177	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4223	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4614	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-1870	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■	LAM9 (42)
	13-1871	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-1936	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-1965	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2253	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2376	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2459	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2836	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2864	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2978	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■	LAM9 (42)

	13-3086	■■■■■■■■■■■■■□□□□■□□□□□□□■■■■■■■□□□□■■■■■■■	Уникальный
	13-3114	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (53)
	13-3147	■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	H4 (262)
	13-3208	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	LAM9 (42)
	13-3318	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3373	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3390	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3742	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3917	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3918	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4781	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
Б	13-2566	■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	H4 (127)
	13-2975	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-2987	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3055	■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□■■■■■■■	H4 (127)
	13-3085	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3158	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	LAM9 (42)
	13-3292	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3387	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3537	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3538	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3539	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■□■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (173)
	13-3582	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T2 (118)
	13-3594	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■□■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (173)
	13-3617	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T2 (118)
	13-3629	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-3632	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T2 (118)
	13-3896	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (1252)
	13-3935	■■■■■■■■■■■■■□□□■□□□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (766)
	13-4009	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4050	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4148	■■■■■■■■□□□■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (2616)
	13-4178	■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1(264)

	13-4189	■■■■■■■■□□□■■■□■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	T1 (2616)
	13-4220	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■	Beijing (1)
	13-4446	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■	Beijing (1)

Таблица 3. Результаты генотипирования изолятов *M. tuberculosis* (MIRU-VNTR)

ID	MLVA MtbC15-9	MLVA MtbC15	MLVA MtbC9	SpolDB4 ST	SpolDB4 Lineage	best matching db-strain lineage #1	match distance #1
13-2041	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-1780	1065-32	1065	32	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-2078	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2105	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2243	1065-133	1065	133	1	BEIJING	Beijing	0,041667
13-2292	?-15	?	15				
13-2385	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2392	1066-32	1066	32	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-2432	94-32	94	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2674	1066-32	1066	32	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-2776	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3134	96-145	96	145	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-3435	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3636	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3805	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0,022727
13-4064	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-4152	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-4177	94-32	94	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-4223	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0,045455
13-4614	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-1871	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-1936	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-1965	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0

13-2253	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2376	?-133	?	133	1	BEIJING	Beijing	0,043478
13-2459	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2836	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2864	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2978	842-52	842	52	42	LAM9	LAM	0,020833
13-3086	?-52	?	52			LAM	0,074128
13-3114	?-26	?	26	53	T1	S	0,169089
13-3147	?-15	?	15	262	H4	URAL	0,125
13-3208	13572-52	13572	52	42	LAM9	LAM	0,0625
13-3318	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3373	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3390	94-32	94	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3742	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3917	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3918	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0,021739
13-4781	100-32	100	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-2566	?-65	?	65			NEW-1	0,106589
13-2975	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0,065217
13-3055	?-15	?	15	127	H4	URAL	0,085756
13-3085	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-3158	13916-51	13916	51	42	LAM9	LAM	0,083333
13-3292	9356-32	9356	32	1	BEIJING	Beijing	0,041667
13-3387	9343-32	9343	32	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-3537	9344-32	9344	32	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-3538	9344-32	9344	32	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-3539	?-15	?	15	118	T2		
13-3582	?-164	?	164	118	T2		
13-3594	?-15	?	15				
13-3617	?-16	?	16	118	T2		

13-3629	99-332	99	332	1	BEIJING	Beijing	0,020833
13-3632	?-15	?	15	118	T2		
13-3896	?-26	?	26	1252	T1	Cameroon	0,162306
13-3935	?-52	?	52	766	T1	LAM	0,053295
13-4009	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0,045455
13-4050	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-4178	11418-51	11418	51	264	T1	LAM	0,083333
13-4189	?-15	?	15				
13-4220	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0
13-4446	?-32	?	32	1	BEIJING	Beijing	0,043478

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. **Маслову Дмитрию Антоновичу** 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; **Алексею Александровичу Ватлину** и **Акимовой Наталье Игоревне**.

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., **Кравченко Марионеллу Анатольевну** и к.б.н. **Умпелеву Татьяну Валерьевну**, 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. **Огаркова Олега Борисовича**.

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