

Акимова Наталья Игоревна

**Стресс-адаптивные характеристики систем токсин-антитоксин II типа *VapBC46*
Mycobacterium tuberculosis и *VapBC2 Mycolicibacterium smegmatis***

1.5.7. – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена в Лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

Научный руководитель: Даниленко Валерий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Официальные оппоненты: Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Москва

Мелькина Ольга Евгеньевна, кандидат биологических наук, исполняющий обязанности начальника лаборатории генетики бактерий Геномного центра «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии» Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д 002.214.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова Российской академии наук по адресу: г. Москва, улица Губкина, д. 3, 119991 Тел: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41. Факс: (499) 132-89-62, e-mail: dissovvet@vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН и на сайте www.vigg.ru.

Автореферат разослан « » _____ 202 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,

Горячева Ирина Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Системы токсин-антитоксин (ТА) представляют собой оперон, состоящий, как правило, из двух генов, один из которых кодирует стабильный токсин, а другой – нестабильный антитоксин. Системы ТА обнаружены в геномах большинства видов бактерий. Разные виды бактерий содержат различное количество модулей ТА. Значительное число модулей ТА обнаружено в геноме возбудителя туберкулёза – *Mycobacterium tuberculosis*. Предполагается, что такая многочисленность систем ТА необходима для быстрой адаптации патогена к стрессовым воздействиям различной природы. Кроме того, модули ТА могут играть важную роль в переходе *M. tuberculosis* в дормантное состояние, в котором бактериальные клетки становятся невосприимчивыми (толерантными) к действию большинства известных антимикробных агентов. Это является причиной возникновения персистирующих форм патогенных бактерий, которые при прекращении стрессовых воздействий способны вернуться в метаболически активное состояние, что может привести к реактивации заболевания. Известно, что системы ТА *M. tuberculosis* взаимодействуют друг с другом, образуя единую сеть. Среди многообразия модулей ТА *M. tuberculosis* можно выделить ключевые, от активности которых зависит функционирование всей сети. Компоненты таких модулей могут рассматриваться в качестве перспективных биомишеней. В связи с этим возрастает значимость исследований влияния мутаций в генах систем ТА на активность кодируемых ими белков. В качестве одной из таких ключевых систем может рассматриваться система ТА *VapBC46* (от *virulence associated protein*), экспрессия которой активируется в ответ на стрессовые воздействия различной природы [Gupta et al., 2017]. Кроме того, данная система ТА интересна тем, что в высоковирулентной сублинии *M. tuberculosis* Beijing-B0/W-148 была обнаружена мутация в гене токсина *vapC46* C₁₁₃G [Zakharevich et al., 2019]. Особый интерес представляет изучение данной мутации и последующая оценка её влияния на адаптацию *M. tuberculosis* к стрессовым факторам среды, воздействующим на бактериальную клетку при инфицировании организма-хозяина. В связи с тем, что мутация C₁₁₃G приводит к замене аланина (незаряженная гидрофобная аминокислота) на глицин (незаряженная гидрофильная аминокислота) в PIN-домене, её результатом может стать изменение структуры, и как следствие, функции токсина *VapC46*. У *Mycobacterium. smegmatis* – модельного объекта для *M. tuberculosis* - обнаружено 8 пар систем токсин-антитоксин II типа. Система токсин-антитоксин *VapBC2* (MSMEG_6760-6762), является вторым представителем семейства *VapBC* у *M. smegmatis* с полученной методом рентгеноструктурного анализа 3D структуры белка токсина. Интересен тот факт, что, помимо свойственного системам *VapBC* PIN-домена и РНКазной активности, *VapC2*, предположительно, может регулировать активность шаперонного белка *DnaK*. Кроме того, было обнаружено, что белки *VapC2* (MSMEG_6760) и *VapB2* (MSMEG_6762) *M. smegmatis* являются структурными гомологами белков *M. tuberculosis* - *Rv2035* и *Rv2034*, соответственно. Показано, что гомолог антитоксина - *Rv2034* активирует экспрессию гена *dosR*, который кодирует белок, индуцирующий переход бактерии в состояние покоя (ключевой регулятор адаптации *M. tuberculosis* к гипоксии при нахождении бактерий внутри макрофагов) [Keren et al., 2011]. В связи с вышеперечисленными особенностями данная система токсин-антитоксин *M. smegmatis* представляет особый интерес для изучения и понимания возможных механизмов перехода клеток в дормантное состояние и формирования антибиотикотолерантности.

Степень разработанности темы исследования. В более ранних работах были получены трёхмерные структуры белков антитоксина *VapB46* и токсина *VapC46*, осуществлена оценка рибонуклеазной активности токсина *VapC46* и определены сайты связывания антитоксина *VapB46* с промотором модуля [Roy et al., 2020]. Однако в литературе отсутствуют данные о влиянии мутации C₁₁₃G на адаптацию бактериальных клеток к стрессовым воздействиям и на РНКазную активность токсина *VapC46*.

Ранее была получена трёхмерная структура белка токсина VarC2 *M. smegmatis* и проведён биоинформатический анализ, на основании которого было сделано предположение, что данный токсин обладает РНКазной активностью и может повышать активность шаперонного белка DnaK [Bajaj et al., 2016]. Экспериментальные данные по изучению функциональной активности токсина VarC2 отсутствуют. Кроме того, в предыдущих работах было показано, что сверхэкспрессия гена *vapB2* приводит к ингибированию роста *M. smegmatis* за счёт активации нуклеазы MSMEG_1275, вносящей двунитевые разрывы в ДНК бактериальных клеток [Duan et al., 2022]. Также в более ранних работах был получен штамм *M. smegmatis* с делециями всех 8 модулей ТА и проведена оценка его устойчивости к окислительному стрессу, стрессу, связанному с лимитированием нутриентов, и воздействию антибиотиков [Zhang et al., 2022]. Вместе с тем, роль отдельной системы ТА VarBC2 *M. smegmatis* в адаптации к стрессу остаётся неустановленной.

Цель работы: выявление стресс-адаптивных функций модулей ТА *vapBC2 M. smegmatis* и *vapBC46 M. tuberculosis* на модельной системе *M. smegmatis*.

Задачи:

1. Оценить влияние гена *vapC46* в составе вектора pKW08-MCS-Int и его мутантного варианта *vapC46* (C₁₁₃G) на рост культуры *M. smegmatis* в нормальных условиях.
2. Проанализировать влияние гена *vapC46* w.t. и *vapC46* (C₁₁₃G) на рост модельного объекта *M. smegmatis* в условиях воздействия антибиотиков, окислительного стресса и стресса, связанного с лимитированием источников азота и углерода.
3. Получить варианты *M. smegmatis*, содержащие делеции гена антитоксина ($\Delta vapB2$), токсина ($\Delta vapC2$) и целого модуля ТА ($\Delta vapBC2$), а также дополнительные копии гена антитоксина (2**vapB2*) и токсина (2**vapC2*) и изучить их влияние на стресс-адаптивные свойства.
4. Изучить участие компонентов системы ТА в регуляции экспрессии генов MSMEG_5244, MSMEG_3944 (регулятор *dosR*) и гена MSMEG_6764 (кодирует TetR-подобный транскрипционный регулятор).
5. Исследовать участие модуля ТА *vapBC2 M. smegmatis* в регуляции метаболизма глицерина.
6. Провести клонирование генов *vapC2*, *vapC46* w.t. и *vapC46* C₁₁₃G в *Escherichia coli* и выделить рекомбинантные белки VarC2 и VarC46.
7. Провести оценку РНКазной активности белков VarC2 *M. smegmatis* и VarC46 w.t. и VarC46 mut *M. tuberculosis*.
8. Исследовать шаперонную активность белка VarC2 *M. smegmatis* и оценить возможность его участия в регуляции активности шаперона DnaK в качестве ко-шаперона.

Научная новизна: в работе впервые исследовано влияние систем токсин-антитоксин II типа VarBC46 *M. tuberculosis* и VarBC2 *M. smegmatis* на лекарственную устойчивость и выживаемость клеток *M. smegmatis* в условиях воздействия стрессовых факторов различного происхождения (лимитирование источников азота и углерода и окислительный стресс), а также проанализировано влияние мутации, связанной с заменой оснований, на функцию белка VarC46. Кроме того, было проведено экспериментальное исследование влияния VarC2 на функциональную активность главного шаперонного белка микобактерий DnaK. Также была впервые проведена оценка РНКазной активности токсина VarC2.

Практическая значимость: Системы токсин-антитоксин являются одной из наиболее перспективных биомишеней клетки, что обуславливает их особую значимость при борьбе с патогенными бактериями. В работе было показано, что накопление высоких концентраций антитоксина VarB2 в клетках *M. smegmatis* приводит к замедлению скорости роста. Кроме того, было показано, что оба токсина обладают РНКазной активностью,

причём однонуклеотидная замена в гене *varC46* слабо влияет на РНКазную активность токсина *VarC46*, но приводит к утрате токсического эффекта. Полученные данные могут стать основой для дальнейших исследований способов активации систем ТА, результатом которой должна стать гибель бактериальных клеток. Кроме того, результаты, полученные в данной работе, позволяют прояснить возможный механизм участия систем токсин-антитоксин в формировании природной лекарственной устойчивости, что также может иметь большое значение при разработке более эффективных антимикробных соединений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Токсин *VarC46 M. tuberculosis* участвует в регуляции ответа клеток *M. smegmatis* на кратковременное воздействие окислительного стресса.
2. Мутация *C113G* приводит к изменениям в структуре токсина *VarC46*, но слабо влияет на его РНКазную активность.
3. Токсин *VarC2 M. smegmatis* обладает РНКазной активностью.
4. Система ТА *VarBC2* участвует в регуляции роста *M. smegmatis* в условиях недостаточного содержания глицерина.

Степень достоверности и апробация работы

Автором опубликовано 3 статьи по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Промежуточные результаты диссертационной работы были представлены на научно-практической конференции с международным участием «Исследования и инновации в современной фтизиатрии», Новосибирск 16-17 сентября 2021. Доклад на тему: «Роль модуля токсин-антитоксин *varBC2 M. smegmatis* в регуляции лекарственной устойчивости и ответа на окислительный стресс».

Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2018-2022 гг.

Апробация работы проведена на межлабораторном семинаре ИОГен РАН (протокол №22/6 от 22 июня 2023 г.).

Личный вклад автора в исследование

Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и проведении экспериментов, оценке и интерпретации результатов. Выделение РНК для проведения анализа транскрипции генов, наработка и выделение белков *VarC46* и *VarC2*, определение их рибонуклеазной активности, а также определение шаперонной активности *VarC2* проводилось совместно с с.н.с. к.б.н. Беккер О. Б. Автор лично проводил анализ полученных результатов и оформлял результаты для представления в виде доклада на научной конференции, а также принимал участие в написании статей по результатам работы.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений и словаря терминов, списка цитируемой литературы и благодарностей. Работа изложена на 158 страницах машинописного текста, включает 18 таблиц и 56 рисунков. Список используемой литературы содержит 213 публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Первый раздел посвящён рассмотрению различных типов систем ТА, а также функций и механизмов регуляции систем ТА II типа. Дополнительно вводится понятие стресс-адаптивной характеристики. Во втором разделе рассматриваются микобактериальные системы ТА и их предполагаемые функции. Основное внимание уделяется системам ТА *VarBC46 M. tuberculosis* и *VarBC2 M. smegmatis*. Третий раздел содержит информацию об участии систем ТА в регуляции фолдинга белков и транскрипции генов *dosR*. Четвёртый раздел посвящён прикладному применению систем ТА в генетической инженерии и терапии инфекционных заболеваний.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использовали штаммы *Escherichia coli* DH5 α , BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21(DE3) CodonPlus, NiCo21 (DE3), B834 (DE3), а также штамм *M. smegmatis* mc² 155.

Для культивирования клеток *E. coli* использовали среду LB (Лурия Бертани, Amresco, США). Твёрдые среды содержали 2% бактериологического агара. Для культивирования клеток *M. smegmatis* mc² 155 в жидкой среде использовали среды Middlebrook 7H9 (Himedia, Индия) с добавлением OADC, 7H9 с добавлением 0,05% глюкозы, 7H9 с добавлением 0,1% глицерина, Lemco Tween-80 (Lemco TW), а также минимальные среды. Культивирование бактерий в жидкой среде проводили при 37°C и 250 об/мин. Для культивирования клеток *M. smegmatis* на твердой среде использовали Триптон-соевый агар M290 (Himedia, Индия). При необходимости добавляли антибиотики. Для культуры *E. coli* штаммов DH5 α , BL21 и B834 в среды добавляли 50 мкг/мл канамицина (Биохимик, Россия), или 150 мкг/мл ампициллина (Синтез, Россия) (в зависимости от используемой векторной плазмиды: pET28a, или pET32a, соответственно). При культивировании *E. coli* pLysS в среды дополнительно добавляли хлорамфеникол (Фармстандарт, Россия) в концентрации 22,5 мкг/мл. Для *E. coli* CodonPlus дополнительно добавляли 22,5 мкг/мл хлорамфеникола (Фармстандарт, Россия) и 8 нг/мл тетрациклина (Sigma, США).

Также при получении делеционных мутантов при работе с культурой *E. coli* DH5 α добавляли 250 мкг/мл Гигромицина Б (Invitrogen, США) и 50 мкг/мл канамицина (Биохимик, Россия), для культуры *M. smegmatis* 50 мкг/мл гигромицина Б (Invitrogen, США), 20 мкг/мл канамицина (Биохимик, Россия) и 20 нг/мл тетрациклина (Sigma, США).

Трансформация бактериальных клеток

Получение химически компетентных клеток *E. coli* для трансформации осуществляли с использованием 0,1 М CaCl₂. Электрокомпетентные клетки *M. smegmatis* были получены после трёхкратной отмычки в 10% охлаждённом растворе глицерина и последующего центрифугирования в течение 10 минут при t=+4°C и 3000*g из культуры с OD₆₀₀~0,8-1,0. Полученные компетентные клетки *M. smegmatis* трансформировали методом электропорации в 10% глицерине.

Оценка скорости роста клеток *M. smegmatis* в жидкой среде

Культуру разбавляли свежей средой до $OD_{600} \sim 0,05$ и инкубировали при $37^{\circ}C$ и 250 rpm. Через равные временные промежутки проводили измерение оптической плотности культуры.

Оценка лекарственной чувствительности штаммов *M. smegmatis*

Проводили методом определения минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков (МИК). Для поиска МИК использовали метод серийных двукратных разведений антибиотиков в жидкой среде 7H9 с использованием антибиотиков: эритромицина, офлоксацина (Синтез, Россия), рифампицина (Sigma, США). При исследовании модуля VarBC2 *M. smegmatis* дополнительно к вышеуказанным антибиотикам был использован канамицин (Биохимик, Россия). Оценка роста или его отсутствия проводили визуально через 3 дня инкубации при $37^{\circ}C$.

Проведение стрессовых воздействий

Для изучения влияния окислительного стресса на рост и выживаемость клеток *M. smegmatis* использовали H_2O_2 в конечной концентрации 0,5 mM, которую добавляли к культуре *M. smegmatis* в ранней логарифмической стадии роста и инкубировали при $37^{\circ}C$ и 250 rpm в течение 2 ч. Через 10 мин, 0,5 ч, 1 ч и 2 ч осуществляли отбор проб для измерения OD_{600} и засева на чашки с твёрдой средой для оценки выживаемости. В качестве контроля использовали культуру *M. smegmatis*, в которую не была добавлена H_2O_2 .

При изучении влияния стресса, связанного с недостатком питательных соединений на рост *M. smegmatis*, использовали минимальные среды, в которых осуществляли инкубацию *M. smegmatis* в течение 140 ч. Через 16, 24 и 140 ч инкубации осуществляли отбор проб для измерения OD_{600} и оценки выживаемости.

Оценка выживаемости клеток *M. smegmatis* в условиях стрессовых воздействий

Проводилась путём засева серии десятикратных разведений культуры на чашки с твёрдой средой M290, инкубации чашек при $37^{\circ}C$ в течение 3 дней и последующего подсчёта числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

Плазмидные векторы

Для проведения клонирования и экспрессии генов в *E. coli* были использованы векторы pET28a и pET32a (Novagen), для *M. smegmatis* - pKW08-MCS-Int, p2NIL, pGOAL19.

Манипуляции с ДНК

Олигонуклеотиды для клонирования, для проведения ПЦР в реальном времени, а также для секвенирования образцов по Сэнгеру были подобраны с использованием Primer BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Праймеры для сайт-направленного мутагенеза были сконструированы с использованием программы Oligo 7. Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы биотехнологической компанией «Евроген».

Реакцию амплификации ДНК методом ПЦР проводили с использованием наборов Tersus plus PCR kit (Евроген, Россия) и Bio Taq (DiaLat, Россия) на приборе Thermal Cycler T 100 (Bio-Rad, США). Подбор условий реакции амплификации смеси проводили с использованием температурного и концентрационного ($MgCl_2$) градиента.

Сайт-направленный мутагенез проводили по методике Parish and Brown (2009).

Выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора Cleanup Mini (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора Plasmid Miniprep kit (Евроген, Россия).

Реакцию рестрикции проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции с укороченным временем реакции Fast Digest (Thermo Scientific, США) – *EcoRV*, *HindIII*, *NdeI*, *KpnI*, *BamHI* и *PacI*.

Реакция лигирования проводилась с использованием T4 ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США). при температуре 22°C в течение 1 часа. Молярное соотношение вектора и вставки в реакционной смеси составляло 1:5.

Для анализа длины и количества фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле (агароза Amresco, США) в электродном буфере TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6). В качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК фага λ (*EcoRI/HindIII*) (Thermo Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler (Thermo Scientific, США).

Манипуляции с РНК

Выделение РНК осуществляли по стандартной методике. Качественный анализ выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле, количественный - с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

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

Реакцию обратной транскрипции проводили на приборе Thermal Cycler T 100 (Bio-Rad, США) с использованием набора iScript Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, США), следуя рекомендациям фирмы-производителя.

Реакцию амплификации в режиме реального времени проводили на приборе Bio-Rad CFX96, применяя набор iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) согласно рекомендациям производителя. Для оценки относительного уровня экспрессии модуля TA использовали экспрессию генов *sigA* и *polA*. Все эксперименты проводили в трех независимых повторах. Вычисление относительного нормализованного уровня экспрессии генов исследуемых генов осуществляли по методу $\Delta\Delta Cq$ [Haimes and Kelley, 2014].

Манипуляции с белками

Индукцию экспрессии токсинов VarC46 и VarC2 проводили путём инкубации экспрессионных штаммов *E. coli* в присутствии 1 mM IPTG. После чего клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в лизирующем буфере (10 mM Tris-HCl pH=8,0; 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, 0,1 mM PMSF), обрабатывали ультразвуком на приборе Sonics vibra cell (Sonics and materials Inc, США), после которого осуществляли центрифугирование для разделения на растворимую фракцию (лизат) и нерастворимую (тельца включения).

Выделение белков из растворимой фракции проводили с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Германия).

Оценку наличия белков VarC46 и VarC2 проводили с помощью 12,5% Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Концентрации выделенных белков определяли на флуориметре Qubit (Invitrogen, США) с использованием набора Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen, США).

Исследование РНКазной активности проведено по методике, описанной в статье Ramage et al. (2009). В качестве субстрата использовали РНК микобактериального бактериофага MS2 (Roche Applied Science, Германия).

Исследование шаперонной активности токсина VarC2 с использованием β -галактозидазы проводилось по методу Такаюама (1997).

Также было проведено исследование шаперонной активности VarC2 с использованием люциферазы светлячка *Photinus pyralis* (Promega) с субстратом люциферин. Сначала также проводилось построение калибровочной кривой. Для этого была приготовлена серия разведений люциферазы в буфере для рефолдинга. Были использованы следующие концентрации люциферазы: 8,06 пмоль, 4,03 пмоль, 2,015 пмоль, 1,007 пмоль, 0,504 пмоль, 0,252 пмоль, 0,126 пмоль. К серии разведений было добавлено 45 мкл буфера для рефолдинга. Все образцы раскапывались в 96-луночный планшет. Измерение люминесценции осуществляли на приборе Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, США) для количественной оценки люминесценции использовали программу Multimode Analysis Software X_DTX880_Lumi_1000ms.

Люциферазу денатурировали в 6 М гуанидин-гидрохлориде в течение 30 минут при 30°C. Реакция рефолдинга денатурированной люциферазы в концентрации 4,03 пмоль проводилась при 37°C в буфере для рефолдинга. В реакционный буфер добавляли VarC2 в концентрации 43,44 пмоль и DnaK до конечной концентрации 14,49 пмоль.

Биоинформатический анализ

Проводили с использованием следующих программ и баз данных: BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), UniProt (<https://www.uniprot.org>), STRING database (<https://string-db.org>), PredictSNP (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) и trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>).

Статистическая обработка результатов

Все опыты проводили в трёх независимых повторах. Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчёт стандартных отклонений, на основании которых делали вывод о достоверности обнаруженных различий. В качестве дополнительного метода оценки статистической значимости обнаруженных различий использовали метод ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформатический анализ влияния мутации в гене *varC46* на функцию кодируемого им токсина

Предварительно для определения влияния однонуклеотидной замены в гене *varC46* на функцию токсина VarC46 был проведён биоинформатический анализ с использованием алгоритма PredictSNP. В результате было показано, что замена C₁₁₃G приводит к аминокислотной замене A₃₈G. Согласно результатам, полученным с использованием инструмента MAPP (Multivariate Analysis of Protein Polymorphism), данная мутация может привести к изменению физико-химических свойств токсина VarC46.

Биоинформатический анализ влияния мутации C₁₁₃G *varC46* на структуру токсина VarC46

В связи с тем, что ранее проведённый биоинформатический анализ показал вероятное влияние мутации C₁₁₃G на физико-химические свойства токсина VarC46, дополнительно был проведён анализ влияния мутации C₁₁₃G *varC46* на структуру токсина VarC46 с использованием программы trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) [Du et al., 2021; Wang et al., 2022; Su et al., 2021]. С помощью данной программы были построены структурные модели белка токсина VarC46 и его мутантного варианта VarC46 A38G с коэффициентами точности 0,854 и 0,870, соответственно.

Было показано, что однонуклеотидная замена C₁₁₃G приводит к изменениям структуры токсина VarC46. Наиболее выраженные изменения обнаружены в активном центре белка в α -цепях 5 и 7 и в β -листе 3 (Рисунок 1).

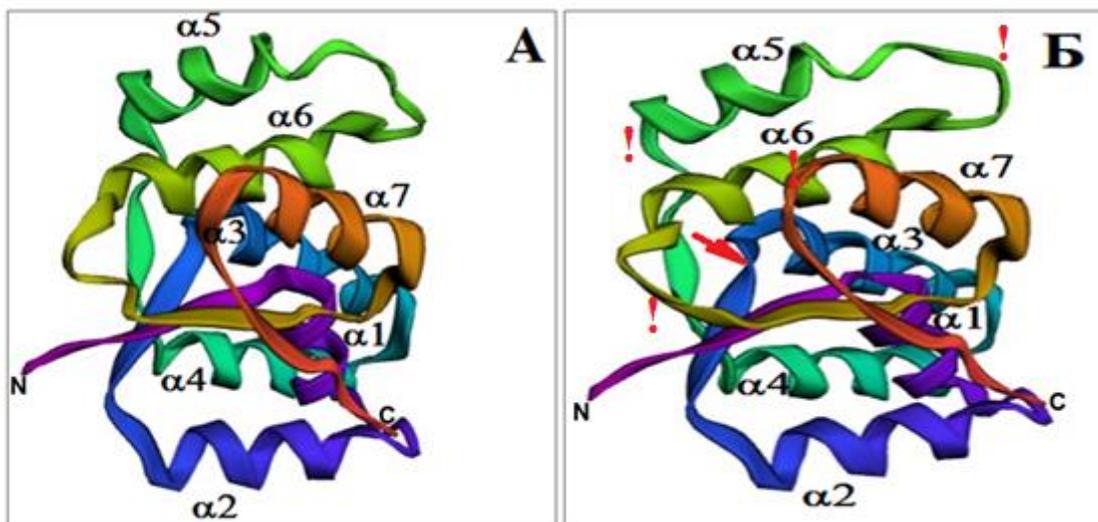


Рисунок 1. Структурные модели белка VarC46, полученные с использованием программы trRosetta: А- VarC46 w.t., Б – VarC46 mut. Цветом обозначены: фиолетовый – N-конец белка, красный – С-конец. Стрелкой обозначен участок, в котором, предположительно, локализована мутация. (!) – обозначены участки с наиболее выраженными изменениями.

Вероятно, аминокислоты, локализованные в данных участках, взаимодействовали с аланином (A38), который в мутантном белке VarC46 был заменён на глицин.

Анализ влияния гена *varC46* в составе вектора pKW08-MCS-Int и его мутантного варианта на рост клеток-трансформантов *M. smegmatis*

Для последующего анализа влияния исходного и мутантного варианта гена *varC46* на рост клеток *M. smegmatis* было осуществлено клонирование *varC46* дикого типа и его мутантного варианта в *M. smegmatis*. В качестве векторной плазмиды для гетерологичной экспрессии гена *varC46* использовали челночный интегративный вектор pKW08-MCS-Int, интеграция которого осуществляется в строго специфичном участке хромосомы *M. smegmatis* и способствует экспрессии одной копии клонируемого гена при индукции тетрациклином. Отсутствие гомологов *varC46* в геноме *M. smegmatis* позволяет наиболее полно охарактеризовать функции токсина VarC46 на примере данного модельного объекта.

Исследование скорости роста трансформантов *M. smegmatis* показало, что экспрессия гена *varC46* дикого типа приводит к замедлению роста трансформантов *M. smegmatis* на протяжении всего периода инкубации после индукции, в то время как экспрессия мутантного варианта *varC46* не влияет на скорость роста относительно контроля (Рисунок 2). Таким образом, мутация в гене *varC46* восстанавливает нормальную скорость роста.

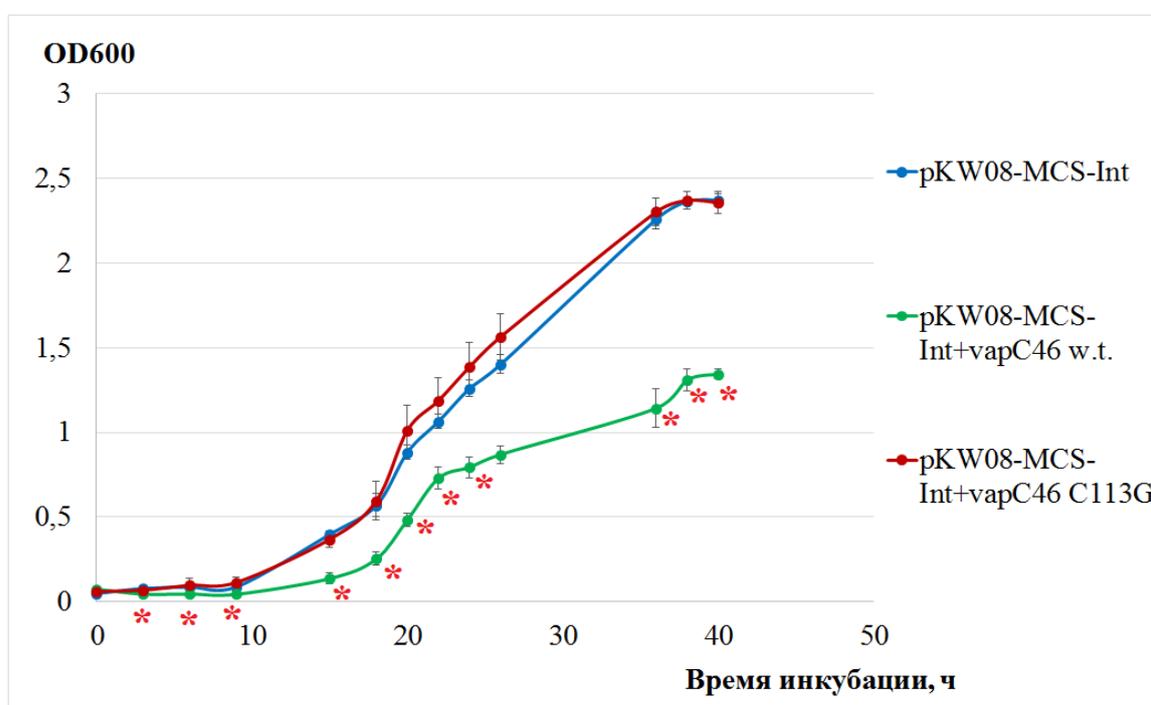


Рисунок 2. Кривая роста культуры трансформантов *M. smegmatis*, содержащих векторную плазмиду без вставки (pKW08-MCS-Int), со вставкой гена *varC46* w.t. (pKW08-MCS-Int+*varC46*) и *varC46* C_{113G} (pKW08-MCS-Int+*varC46* C_{113G}). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Оценка влияния гена *varC46* дикого типа и его мутантного варианта на лекарственную чувствительность *M. smegmatis*

Было осуществлено определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) следующих антибиотиков: эритромицина, офлоксацина и рифампицина. Данные антибиотики были использованы в качестве базовых представителей основных химических классов антибиотиков (эритромицин – макролиды, офлоксацин – фторхинолоны, рифампицин – ансамицины) для уточнения различий в уровне лекарственной

чувствительности *M. smegmatis*, обнаруженных в ранних работах (в рамках выполнения проекта БРИКС № 14.613.21.0068, 2017-2019) с помощью диско-диффузионного метода.

Было показано увеличение МИК эритромицина в 2 раза для трансформантов *M. smegmatis* с геном *varC46* (Рисунок 3). При этом однонуклеотидная замена в гене *varC46* не влияла МИК эритромицина относительно дикого типа. Таким образом, вставка как гена *varC46* дикого типа, так и его мутантного варианта приводит к повышению устойчивости *M. smegmatis* к эритромицину. Полученные результаты позволяют предположить участие системы VarBC46 в регуляции устойчивости к эритромицину.

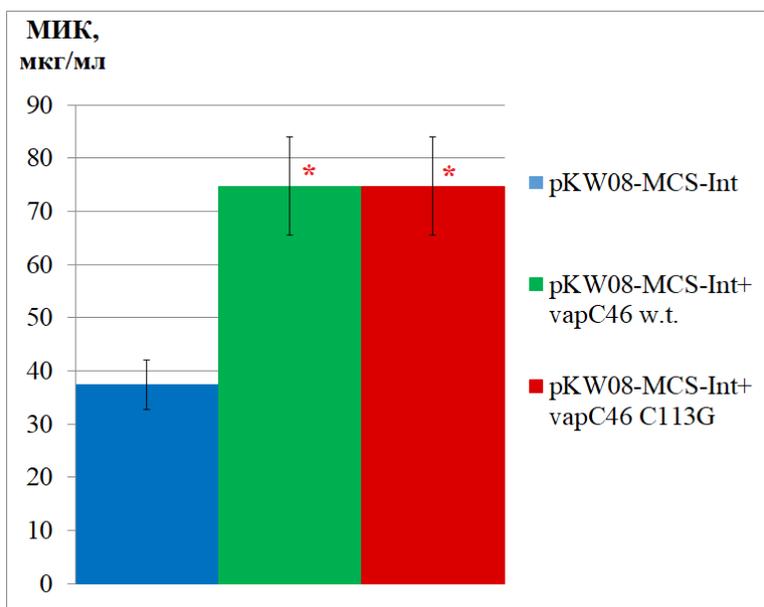


Рисунок 3. Величина МИК эритромицина для трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *varC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *varC46* C₁₁₃G после 72 ч инкубации. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Также было показано, что вставка *varC46* дикого типа приводит к повышению МИК офлоксацина относительно контроля в 2 раза. Напротив, вставка мутантного варианта *varC46* не приводит к изменению МИК относительно контроля. Таким образом, токсин, кодируемый геном *varC46*, вероятно, может участвовать в регуляции устойчивости к офлоксацину, а мутация C₁₁₃G приводит к утрате данной функции.

При оценке МИК рифампицина статистически значимых различий между исследованными трансформантами *M. smegmatis* обнаружено не было.

Исследование влияния *varC46* на рост и выживаемость трансформантов *M. smegmatis* в условиях окислительного стресса

Исследование оптической плотности культуры трансформантов *M. smegmatis*, не содержащих ген токсина *varC46*, а также трансформантов, несущих ген *varC46* дикого типа или его мутантный вариант, при воздействии 0,5 mM H₂O₂ показало отсутствие статистически достоверных различий между данными группами на протяжении всего периода инкубации (Рисунок 4).

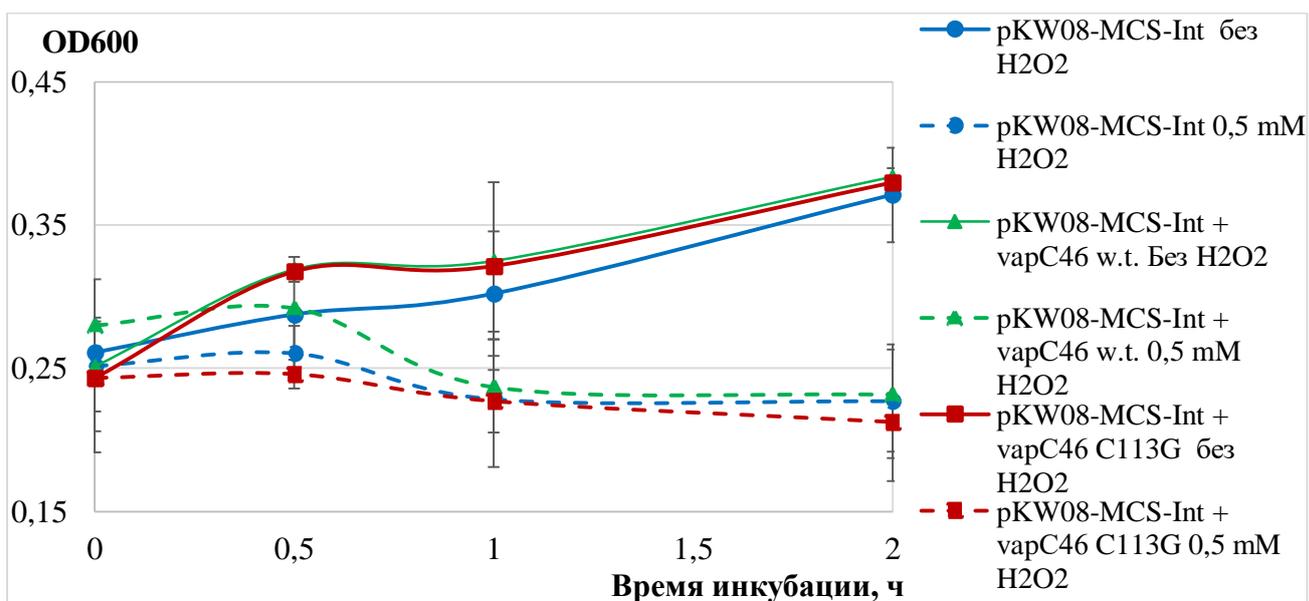


Рисунок 4. Динамика изменения оптической плотности (OD_{600}) культуры трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G в нормальных условиях роста и при воздействии 0,5 mM H_2O_2 . Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

По результатам подсчёта числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и оценки выживаемости трансформантов *M. smegmatis* в условиях окислительного стресса было показано, что вставка как гена *vapC46* дикого типа, так и его мутантного варианта приводит к повышению выживаемости в условиях кратковременного (до 0,5 ч) воздействия 0,5 mM H_2O_2 (Рисунок 5).

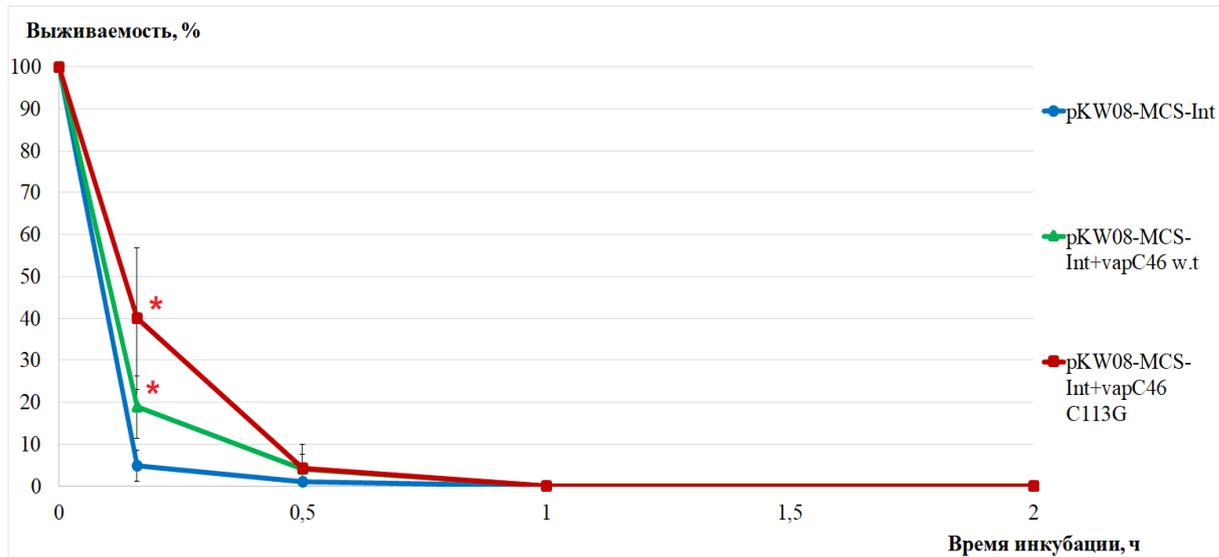


Рисунок 5. Динамика выживаемости трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G в условиях воздействия 0,5 mM H_2O_2 . Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

На основании полученных данных можно предположить, что токсин *VapC46* может участвовать в адаптации бактериальных клеток к окислительному стрессу, связанному с кратковременным воздействием H_2O_2 . При этом мутация в гене *vapC46* не оказывает влияния на данную функцию токсина.

Анализ влияния мутации в гене *varC46* на рост трансформантов *M. smegmatis* в условиях лимитирования источников азота и углерода

Было обнаружено, что вставка *varC46* дикого типа, и его мутантного варианта в условиях лимитирования соединений азота и углерода не приводит к изменению оптической плотности культуры относительно контроля на протяжении всего периода инкубации. В результате подсчёта КОЕ было показано отсутствие статистически достоверных различий между трансформантами *M. smegmatis* с обоими вариантами гена *varC46* и контрольным штаммом на протяжении всего периода инкубации в минимальных средах, не содержащих азот или углерод.

Таким образом, ген *varC46* не влияет на рост культуры в условиях лимитирования источников азота и углерода. На основании полученных результатов можно предположить, что система TA VarBC46 *M. tuberculosis* не участвует в регуляции ответа бактериальных клеток на стресс, связанный с недостаточным поступлением источников азота и углерода.

Оценка влияния мутации на РНКазную активность белка VarC46

В результате исследования было показано наличие РНКазной активности, как у токсина VarC46 дикого типа, так и у его мутантного варианта (Рисунок 6). Были обнаружены лишь незначительные различия в РНКазной активности между белком VarC46 дикого типа и его мутантным вариантом. Таким образом, мутация, связанная с заменой основания аланина на глицин в 38 позиции, несмотря на локализацию в непосредственной близости от одного из аминокислотных остатков (E43), входящих в состав активного сайта VarC46, влияет на РНКазную активность токсина лишь в слабой степени.

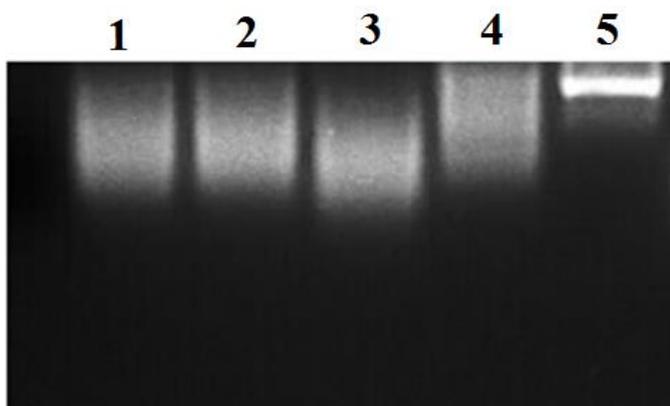


Рисунок 6. Электрофореграмма образцов при оценке РНКазной активности (2 ч инкубация). Цифрами обозначены образцы: 1 – VarC46 w.t., выделенный из *E. coli* BL21; 2 – VarC46 w.t., выделенный из *E. coli* NiCo; 3 – VarC46 mut, выделенный из *E. coli* NiCo; 4 – VarC2 *B. longum*; 5 – РНК бактериофага MS2.

Исследование стресс-адаптивных функций модуля *varBC2 M. smegmatis*

Для определения функциональной значимости модуля *varBC2 M. smegmatis* и его отдельных компонентов было получено несколько различных штаммов (Таблица 1.). Штаммы с делецией были получены с использованием метода сайт-направленного мутагенеза по методике Parish and Brown (2009).

Таблица 1. Штаммы *M. smegmatis*, полученные для исследования функциональной активности модуля *varBC2*

Штамм	Описание
$\Delta varBC2$	делеция модуля <i>varBC2</i>
$\Delta varB2$	делеция гена антитоксина <i>varB2</i>
$\Delta varC2$	делеция гена токсина <i>varC2</i>
$2*varB2$	дополнительная копия гена антитоксина <i>varB2</i> , клонированная в составе челночного интегративного вектора pKW08-MCS-Int
$2*varC2$	дополнительная копия гена токсина <i>varC2</i> , клонированная в составе челночного интегративного вектора pKW08-MCS-Int
mc2 155	Использовали в качестве контрольного штамма при исследовании стресс-адаптивных характеристик делеционных штаммов <i>M. smegmatis</i>
pKW08-MCS-Int	Использовали в качестве контрольного штамма при исследовании стресс-адаптивных характеристик штаммов <i>M. smegmatis</i> с дополнительными копиями генов токсина и антитоксина

Анализ влияния модуля *varBC2* на рост клеток *M. smegmatis* в отсутствие стрессовых воздействий

Анализ скорости роста штаммов *M. smegmatis* при отсутствии стрессовых воздействий показал статистически достоверное замедление роста у трансформантов *M. smegmatis* с дополнительной копией гена антитоксина *varB2* при 16-32 ч инкубации после добавления индуктора (тетрациклин) (Рисунок 7). На основании полученных результатов можно предположить, что модуль *varBC2* участвует в регуляции роста *M. smegmatis* при нормальных условиях инкубации.

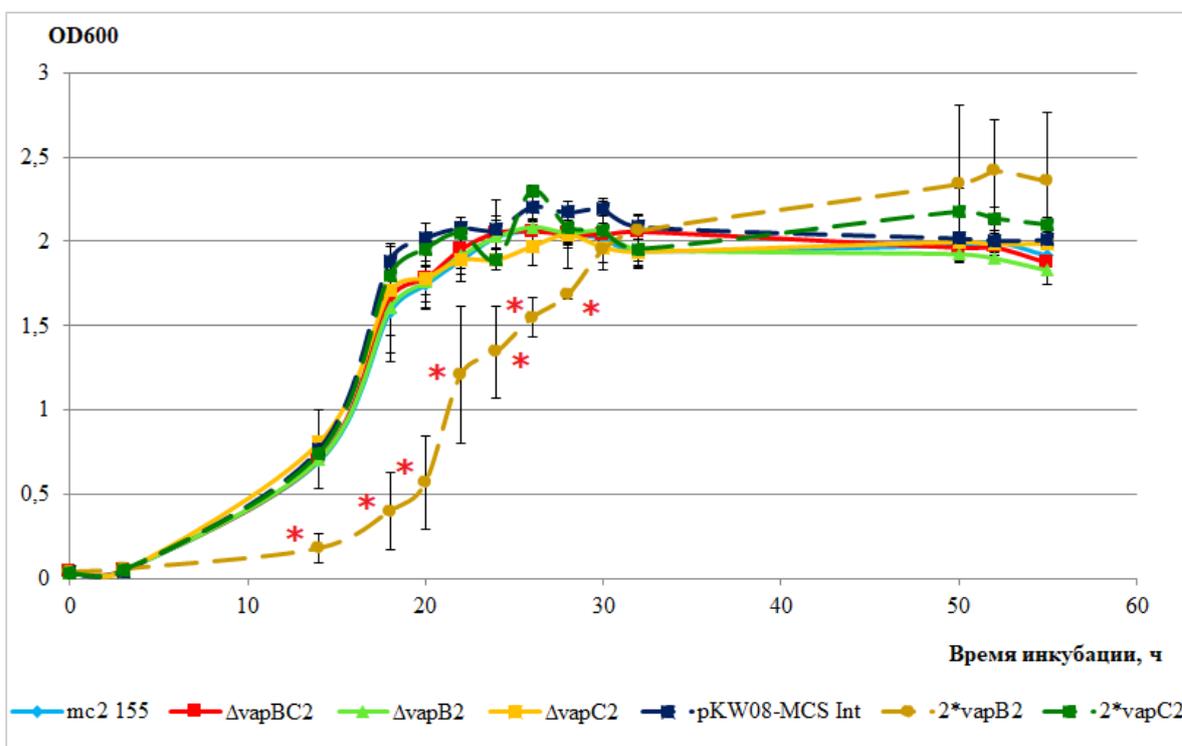


Рисунок 7. Кривая роста штаммов *M. smegmatis* при инкубации в отсутствие стрессовых воздействий. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Анализ влияния модуля *vapBC2* на чувствительность клеток *M. smegmatis* к антибиотикам

В ходе оценки минимальных ингибирующих концентраций эритромицина, офлоксацина, рифампицина и канамицина было показано, что делеции и вставка дополнительных копий генов токсина и антитоксина не влияют на чувствительность *M. smegmatis* к офлоксацину, рифампицину и канамицину от контрольного штамма как у делеционных мутантов *M. smegmatis*, так и у трансформантов с дополнительными копиями генов *vapB2* и *vapC2* (Рисунок 8). Полученные данные позволяют предположить, что система TA *VapBC2*, вероятно, не участвует в регуляции устойчивости к данным антибиотикам.

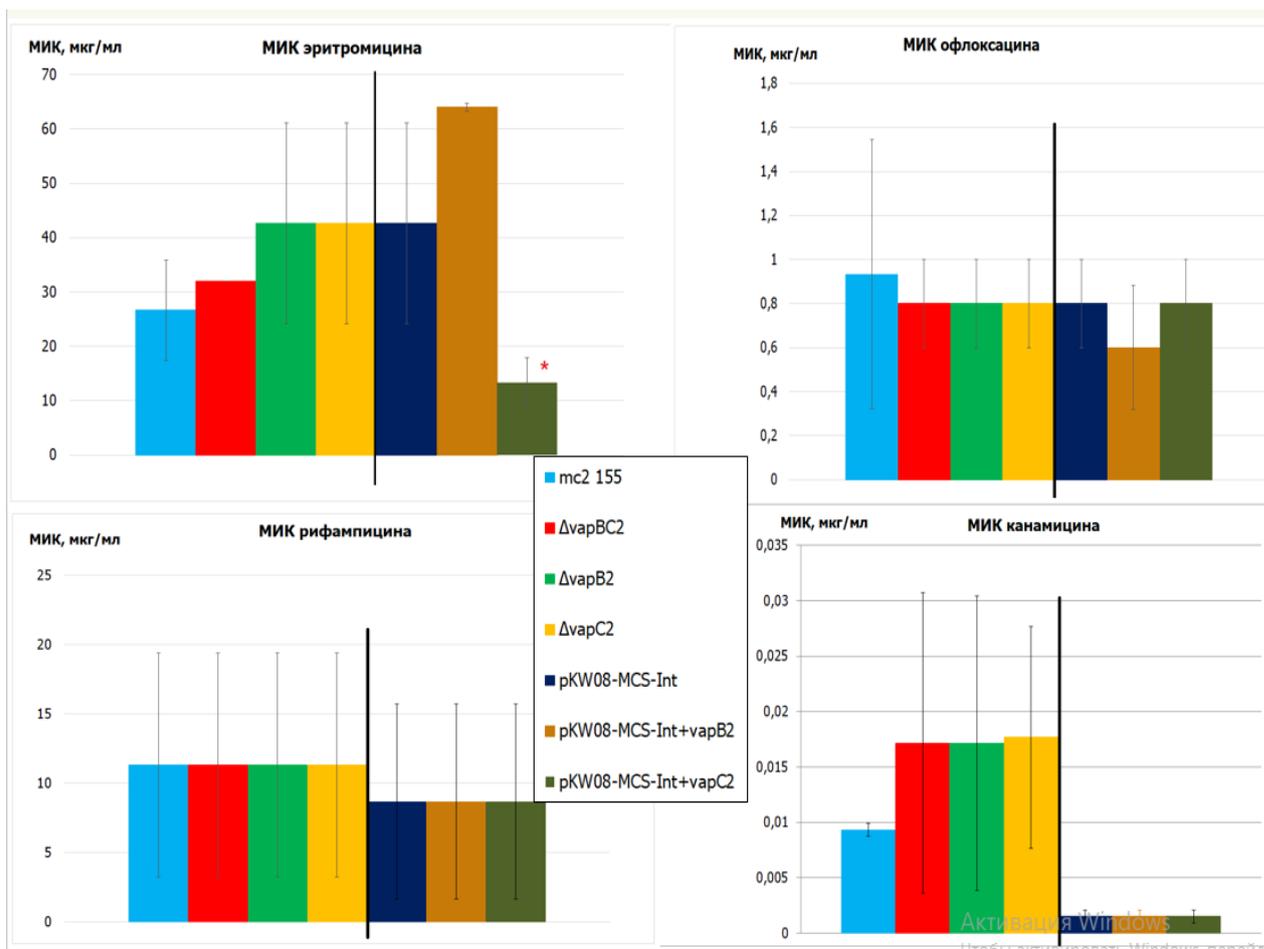


Рисунок 8. Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (мкг/мл) для трансформантов *M. smegmatis*. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Вместе с тем было обнаружено снижение МИК эритромицина для штамма *M. smegmatis* с дополнительной копией гена токсина. Таким образом, экспрессия дополнительной копии гена *vapC2* приводит к повышению чувствительности *M. smegmatis* к эритромицину.

Анализ влияния модуля *vapBC2* *M. smegmatis* на рост и выживаемость в условиях окислительного стресса

В ходе измерения оптической плотности культуры *M. smegmatis* в условиях воздействия 0,5 mM H₂O₂, было показано, что ни делеция целого модуля *vapBC2* (или генов *vapB2* и *vapC2* по отдельности), ни экспрессия дополнительной копии гена токсина или антитоксина не приводят к изменению скорости роста относительно контрольного штамма.

Оценка выживаемости *M. smegmatis* в условиях воздействия 0,5 mM H₂O₂ методом подсчёта числа КОЕ подтвердила отсутствие различий в устойчивости к окислительному стрессу между штаммами. Таким образом, ни делеция, ни сверхэкспрессия генов токсина и антитоксина не влияют на чувствительность *M. smegmatis* к воздействию окислительного стресса. На основании полученных результатов можно предположить, что модуль *TA vapBC2* не участвует в регуляции устойчивости к окислительному стрессу.

Биоинформатический анализ предполагаемых взаимодействий компонентов системы TA VarBC2 с другими клеточными белками

Для определения наличия взаимодействий с другими белками *M. smegmatis* был проведён биоинформатический анализ с использованием базы данных STRING (<https://string-db.org/>). Согласно полученным результатам, не было обнаружено взаимодействий с другими системами TA *M. smegmatis*. На основании близкого расположения генов, кодирующих белки MSMEG_6763, MSMEG_6764 (регулятор транскрипции семейства *tetR*), с генами модуля *varBC2* *M. smegmatis* предполагается наличие взаимодействий между данными белками.

Анализ влияния модуля *varBC2* на уровень экспрессии генов MSMEG_6764 и *dosR*

С помощью анализа генных взаимодействий с использованием базы данных STRING (https://string-db.org/network/246196.MSMEI_6579) было выявлено наличие взаимодействий между токсином *varC2* (MSMEG_6760) и регулятором транскрипции *tetR* (MSMEG_6764).

Для определения наличия взаимодействий между VarBC2 и DosR и TetR на уровне транскрипции был проведён анализ уровня экспрессии генов MSMEG_6764, MSMEG_5244 и MSMEG_3944 у штамма *M. smegmatis* дикого типа и штамма с делецией модуля *varBC2*.

Анализ транскрипционной активности генов MSMEG_6764, MSMEG_5244 и MSMEG_3944 показал изменение уровня транскрипции гена, кодирующего регуляторный белок семейства *tetR* (MSMEG_6764) (Рисунок 9). Было обнаружено, что делеция модуля приводит к снижению уровня экспрессии генов MSMEG_6764 и MSMEG_3944. Также к статистически достоверному снижению уровня транскрипции MSMEG_6764 и MSMEG_3944 приводит экспрессия дополнительной копии гена токсина *varC2*. Это может быть связано с тем, что антитоксин *varB2*, предположительно, является активатором транскрипции MSMEG_6764 и MSMEG_3944, при делеции происходит утрата его функции, а экспрессия дополнительной копии гена токсина *varC2* может приводить к отсутствию свободного (не связанного с токсином) антитоксина, способного осуществлять активацию транскрипции вышеуказанных генов. Обнаруженные различия позволяют предположить наличие взаимодействий между *varB2*, *dosR* и *tetR*, однако для их подтверждения необходимо проведение анализа взаимодействий между антитоксином и промоторами MSMEG_6764 и MSMEG_3944.

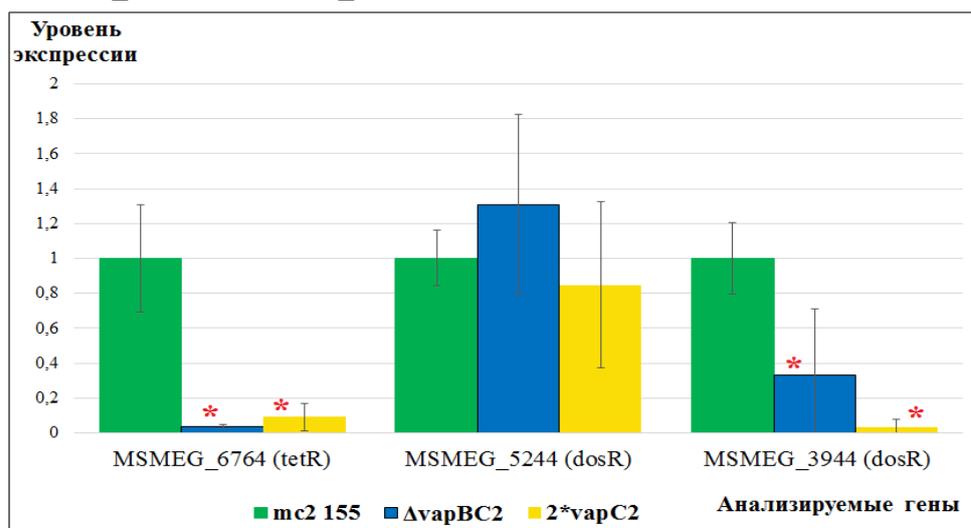


Рисунок 9. Уровень экспрессии оперонов *tetR* и *dosR* в штаммах *M. smegmatis*. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Кроме того, было показано, что делеция *varBC2* не влияет на уровень экспрессии гена из другого оперона *dosR* - *MSMEG_5244*.

Анализ влияния модуля *varBC2* *M. smegmatis* на рост в средах с минимальным содержанием глицерина

В работе McKenzie и др. (2012) содержатся данные об участии токсина VarC2 в метаболизме глицерина. Было обнаружено, что рядом с модулем *varBC2* расположен кластер генов, участвующих в транспорте и метаболизме глицерина. Кроме того, предполагается, что белок MSMEG_6760 (VarC2) непосредственно участвует в метаболизме глицерина, однако его точная функция неизвестна. Для подтверждения данного предположения было проведено исследование скорости роста штаммов *M. smegmatis* в среде 7Н9 с 0,05% глицерином. Было показано, что делеция гена *varC2* приводит к статистически достоверному замедлению роста при переходе в стационарную фазу роста (24-32 ч инкубации) (Рисунок 10).

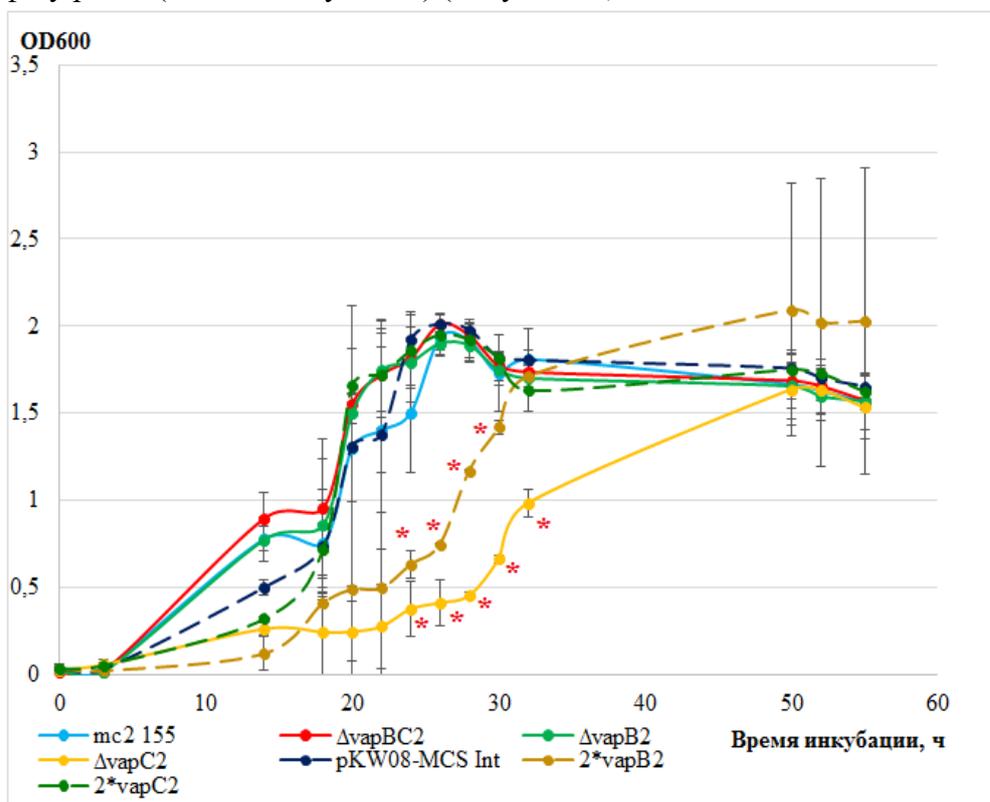


Рисунок 10. Кривая роста штаммов *M. smegmatis* при инкубации в среде 7Н9 с минимальным содержанием глицерина. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Данный результат действительно позволяет предположить участие VarC2 в метаболизме глицерина. Вероятно, делеция *varC2* приводит к ухудшению способности клеток *M. smegmatis* метаболизировать глицерин, что негативно сказывается на скорости роста. Кроме того, при инкубации в среде с минимальным содержанием глицерина отмечается замедление роста не только у штамма *M. smegmatis* с делецией *varC2* ($\Delta varC2$), но и у трансформантов с дополнительной копией гена антитоксина *varB2* ($2*varB2$). При сопоставлении кривых роста на среде с минимальным содержанием глицерина и контрольной среде с глюкозой обнаруживается, что замедление скорости роста трансформантов $2*varB2$ сохраняется, в то время как у штамма $\Delta varC2$ в контрольной среде восстанавливается нормальный рост. Вероятно, замедление роста у трансформантов *M.*

smegmatis с дополнительной копией гена антитоксина *varB2* в контрольной среде и в среде с минимальным глицерином может быть связано с активацией нуклеазы MSMEG_1275, описанной ранее в работе Duan (2022). Основываясь на данных, полученных Duan, а также на кривых роста штаммов *M. smegmatis*, анализируемых в настоящей работе, можно предположить, что вне зависимости от среды, в которой осуществляется инкубация, сверхэкспрессия антитоксина *varB2* приводит к активации экспрессии нуклеазы MSMEG_1275, которая, в свою очередь, может вызывать двунитевые повреждения ДНК клеток *M. smegmatis*, и, как следствие, их гибель.

Оценка РНКазной активности белка VarC2

В ходе проведения исследования было показано наличие РНКазной активности у белка VarC2 (Рисунок 11). Таким образом, экспериментально подтверждено наличие рибонуклеазной активности, предположение о которой было впервые было сформулировано в работе Вајај (2016).

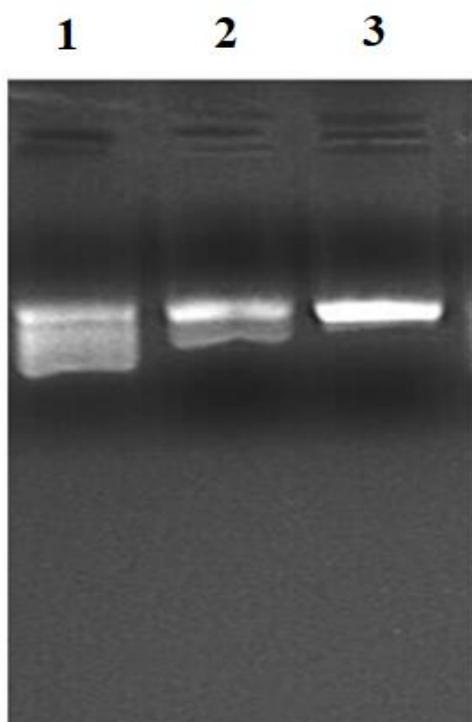


Рисунок 11. Электрофореграмма образцов при оценке РНКазной активности (1 ч инкубация). На рисунке цифрами обозначены образцы: 1 – VarC2 *M. smegmatis*; 2 – VarC2 *B. longum*; 3 – РНК бактериофага MS2.

Определение уровня шаперонной активности белка VarC2

Для определения наличия шаперонной активности у токсина VarC2 были применены две методики: первая из них основана на определении активности предварительно денатурированной β -галактозидазы в присутствии VarC2 и шаперонного белка DnaK, вторая - на определении активности денатурированной люциферазы. По результатам, полученным с использованием обеих методик, было показано, что в присутствии VarC2 и DnaK активность денатурированной люциферазы не изменяется. Таким образом, в исследованных нами условиях токсин VarC2 не участвует в активации шаперонного белка DnaK.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению двух систем ТА II типа семейства VarBC – VarBC46 *M. tuberculosis* и VarBC2 *M. smegmatis*. Согласно данным литературы, системы ТА VarBC46 и VarBC2 могут играть важную роль в адаптации бактериальных клеток к стрессовым воздействиям различной природы.

Проведённое исследование показало, что оба токсина (и VarC46, и VarC2) обладают рибонуклеазной активностью. Также было обнаружено, что оба модуля ТА участвуют в регуляции роста *M. smegmatis* в отсутствие стрессовых воздействий.

Модуль ТА *varBC46 M. tuberculosis* является одним из регуляторов ответа бактериальных клеток на стрессы, который взаимодействует с другими системами ТА. Показано, что токсин VarC46 участвует в ответе бактериальных клеток на кратковременное (до 0,5 ч) воздействие 0,5 mM H₂O₂. Однако система ТА VarBC46 не участвует в ответе клеток *M. smegmatis* на стресс, связанный с лимитированием источников азота и углерода. Также было обнаружено, что VarC46 может участвовать в регуляции устойчивости к эритромицину и офлоксацину. Особый интерес представляло изучение влияния мутации в гене *varC46* C₁₁₃G на функциональную активность токсина VarC46 в связи с тем, что данная мутация была обнаружена в высоковирулентной сублинии *M. tuberculosis* Beijing-B0-148. Анализ значимости однонуклеотидной замены C₁₁₃G с помощью алгоритма PredictSNP показал, что данная мутация может оказывать влияние на физико-химические свойства токсина. В ходе анализа полученных с использованием программы trRosetta трёхмерных моделей VarC46 было показано, что мутация C₁₁₃G приводит к выраженным изменениям в активном центре токсина. Однако при оценке рибонуклеазной активности VarC46 были обнаружены лишь слабо выраженные изменения в уровне РНКазной активности, вызванные мутацией C₁₁₃G. В данной работе была проведена оценка РНКазной активности с использованием в качестве субстрата только мРНК. Учитывая тот факт, что мутация C₁₁₃G приводит к восстановлению нормальной скорости роста *M. smegmatis* в отсутствие стрессовых воздействий, можно предположить, что данная мутация может приводить либо к изменению рибонуклеазной активности в отношении рРНК и тРНК, либо к изменению субстратной специфичности токсина VarC46.

Впервые проведенное исследование участия VarBC2 *M. smegmatis* в регуляции устойчивости к эритромицину, офлоксацину, рифампицину и канамицину показало отсутствие статистически значимых различий в устойчивости к офлоксацину, рифампицину и канамицину между контрольным штаммом *M. smegmatis* и штаммами, полученными в результате клонирования или делеции генов модуля *varBC2*. При этом показано, что вставка дополнительной копии гена токсина *varC2* приводит к повышению чувствительности к эритромицину.

Также было показано отсутствие различий в выживаемости в условиях воздействия окислительного стресса между штаммом *M. smegmatis* дикого типа и штаммами Δ *varBC2*, Δ *varB2* и Δ *varC2*. Полученные результаты могут указывать на то, что система ТА VarBC2, вероятно, либо не участвует в регуляции ответа бактериальных клеток на окислительный стресс и устойчивость к вышеуказанным антибиотикам, либо является минорным модулем ТА, вносящим вклад в устойчивость к стрессам *M. smegmatis* лишь в совокупности с другими системами ТА. На основании полученных данных можно предположить, что система VarBC2 *M. smegmatis* не является ключевым регулятором стресс-ответа бактериальных клеток, оказывающим влияние на функционирование других систем ТА. Также в исследованных нами условиях не было показано участие VarC2 в регуляции активности шаперонного белка DnaK, что ранее предполагалось в работе Вајај и др. (2016).

Кроме того, было показано, что модуль ТА *varBC2* участвует в активации транскрипции одного из генов *dosR*, играющего ключевую роль в регуляции перехода бактериальных клеток в дормантное состояние в ответ на стрессовые воздействия. Полученные данные могут стать основой для дальнейших исследований механизмов

участия систем ТА в переходе бактериальных клеток в дормантное состояние с целью предотвращения возникновения антибиотикотолерантных персистирующих форм *M. tuberculosis*.

Выводы

1. Присутствие гена токсина *vapC46* w.t. *M. tuberculosis* в составе конструкции рKW-MCS-Int+*vapC46* w.t. приводит к замедлению скорости роста *M. smegmatis* и снижает чувствительность к эритромицину в 2 раза.
2. Мутация С₁₁₃G в гене токсина *vapC46* слабо влияет на его РНКазную активность, но возвращает скорость роста к значениям роста *M. smegmatis* без *vapC46* и оставляет устойчивость к эритромицину на уровне *M. smegmatis* *vapC46* w.t., что предполагает его участие в регуляции устойчивости к этому антибиотику.
3. Присутствие гена *vapC46* w.t и *vapC46* mut в составе конструкции рKW-MCS-Int+*vapC46* приводит к повышению выживаемости в условиях кратковременного воздействия H₂O₂ и не влияет на выживаемость *M. smegmatis* в условиях стресса, связанного с лимитированием источников азота и углерода.
4. Система ТА *VapBC2* *M. smegmatis* не участвует в ответе бактериальных клеток на окислительный стресс, обусловленный действием H₂O₂.
5. Отсутствие несвязанного токсина *VapC2* приводит к статистически достоверному замедлению роста *M. smegmatis* при переходе в стационарную фазу.
6. Отсутствие свободного антитоксина *VapB2* приводит к ингибированию экспрессии *MSMEG_6764 (tetR)* и *MSMEG_3944 (dosR)*.
7. Токсин *VapC2* *M. smegmatis* обладает рибонуклеазной активностью и не влияет на активность шаперонного белка DnaK.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

В журналах, рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. **Н. И. Акимова**, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко. Функциональная значимость модуля токсин-антитоксин *Mycobacterium smegmatis* в устойчивости к антибиотикам и воздействию окислительного стресса// ГЕНЕТИКА. – 2022. - том 58. - № 5. - с. 1–12.
2. **N. I. Akimova**, O. B. Bekker, K. V. Shur, V. N. Danilenko. The effect of a mutation in the *vapC46* gene of *Mycobacterium tuberculosis* on the functional activity of the *VapC46* toxin// Russian journal of genetics. – 2023. – Vol. 59, №12.
3. К. В. Шур, О. Б. Беккер, М. В. Зайчикова, Д. А. Маслов, **Н. И. Акимова**, Н. В. Захаревич, М. С. Чекалина, В. Н. Даниленко. Генетические аспекты лекарственной устойчивости и вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* // ГЕНЕТИКА. – 2018. - том 54. - № 12. - с. 1–13.

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

Акимова Н. И., Беккер О. Б., Даниленко В. Н. Роль модуля токсин-антитоксин *vapBC2* *M. smegmatis* в регуляции лекарственной устойчивости и ответа на окислительный стресс// Роль модуля токсин-антитоксин *vapBC2* *M. smegmatis* в регуляции лекарственной устойчивости и ответа на окислительный стресс. – 2021.- Новосибирск. **Устный доклад.**

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** за руководство, наставничество и помощь на всех этапах выполнения работы.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаборатории генетики микроорганизмов за постоянную поддержку, особая благодарность:

Марии Георгиевне Алексеевой и **Диларе Анваровне Мавлетовой** за помощь на стадии работы с белками; **Дмитрию Антоновичу Маслову** и **Кириллу Владимировичу Шуру** за помощь на разных стадиях выполнения работы; **Марии Викторовне Марсовой** и **Татьяне Анатольевне Кошенко**.

Отдельно автор выражает благодарность д.б.н. проф. **Абилеву Серикбаю Каримовичу** и к.б.н, зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России **Шитикову Егору Александровичу** за ценные замечания, сделанные при рецензировании работы.