

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

На правах рукописи

Акимова Наталья Игоревна

**Стресс-адаптивные характеристики систем токсин-антитоксин II типа
VarBC46 Mycobacterium tuberculosis и *VarBC2 Mycolicibacterium smegmatis***

1.5.7. - генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва
2023 год

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Современные представления о системах ТА у бактерий	12
1.1.1. Многообразие систем токсин-антитоксин у прокариот	12
1.1.1.1. Системы ТА I типа	13
1.1.1.2. Системы ТА II типа	14
1.1.1.3. Системы ТА III типа	18
1.1.1.4. Системы ТА IV типа	19
1.1.1.5. Системы ТА V типа	20
1.1.1.6. Системы ТА VI типа	22
1.1.1.7. Системы ТА VII типа	23
1.1.1.8. Системы ТА VIII типа	24
1.1.2. Функции систем ТА II типа	25
1.1.3. Понятие о стресс-адаптивной функции	28
1.1.4. Механизмы регуляции функционирования систем ТА	33
1.1.4.1. Транскрипционный уровень регуляции	33
1.2.4.2. Регуляция на уровне трансляции	35
1.1.4.1. Посттрансляционный уровень регуляции	35
1.1.5. Функционирование систем ТА как единой сети	35
1.1.6. Вклад систем ТА в толерантность и устойчивость к антибиотикам у бактерий	36
1.2. Микобактериальные системы ТА	37
1.2.1. Системы ТА у микобактерий, их количество и распространённость в геномах различных представителей рода <i>Mycobacterium</i>	37
1.2.2. Системы ТА у <i>M. tuberculosis</i>	38
1.2.2.1. Система ТА <i>VarBC46</i> как один из ключевых регуляторов ответа <i>M. tuberculosis</i> на стрессовые воздействия	42
1.2.2.2. Мутация в гене <i>varC46</i> C ₁₁₃ G характерна для высоковирулентной сублинии Beijing-B0/W148 44	44
1.2.3. Системы ТА у <i>M. smegmatis</i>	45
1.2.4. Система ТА <i>VarBC2</i> <i>M. smegmatis</i> , её роль в регуляции роста и ответа бактериальных клеток на стрессовые воздействия	46
1.3. Участие систем ТА в регуляции фолдинга белков и функционирования оперона <i>dosR</i>	49
1.3.1. Участие систем ТА в регуляции фолдинга белков	49
1.3.2. Участие систем ТА в регуляции оперона <i>dosR</i>	52
1.4. Прикладное применение систем ТА	53
1.4.1. Применение систем ТА в генетической инженерии	53
1.4.2. Применение систем ТА в терапии инфекционных заболеваний	55

1.4.2.1. Системы ТА в антибактериальной терапии.....	55
1.4.2.2. Системы ТА в противовирусной терапии.....	57
Глава 2. Материалы и методы	60
2.1. Работа с бактериальными культурами	60
2.1.1. Бактериальные штаммы, использованные в работе	60
2.1.2. Среды и антибиотики, использованные в работе	61
2.1.3. Получение химически-компетентных клеток <i>E. coli</i>	62
2.1.4. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	63
2.1.5. Получение электро-компетентных клеток <i>M. smegmatis</i>	63
2.1.6. Электротрансформация компетентных клеток <i>M. smegmatis</i>	63
2.1.7. Оценка скорости роста клеток <i>M. smegmatis</i> в жидкой среде	64
2.1.8. Оценка лекарственной чувствительности штаммов <i>M. smegmatis</i> методом определения минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков (МИК).....	64
2.1.9. Оценка жизнеспособности трансформантов <i>M. smegmatis</i> , несущих ген <i>varC46</i> и его мутантный вариант <i>varC46</i> S ₁₁₃ G, в условиях стресса, связанного с лимитированием источников азота и углерода	65
2.1.10. Проведение окислительного стресса.....	66
2.2. Работа с нуклеиновыми кислотами.....	67
2.2.1. Плазмидные векторы, использованные в работе	67
2.2.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе	72
2.2.3. Амплификация ДНК.....	74
2.2.4. Получение делеции модуля <i>varBC2</i> <i>M. smegmatis</i>	76
2.2.5. Выделение и очистка ДНК	79
2.2.6. Выделение и очистка плазмидной ДНК.....	79
2.2.7. Реакция рестрикции.....	79
2.2.8. Реакция лигирования.....	79
2.2.9. Горизонтальный электрофорез ДНК и РНК в агарозном геле	79
2.2.10. Выделение РНК	80
2.2.11. Проведение реакции обратной транскрипции	80
2.2.12. Амплификация ДНК в режиме реального времени	81
2.3. Работа с белками.....	82
2.3.1. Выделение белков VarC46 и VarC2 из клеточного лизата	82
2.3.2. Выделение белков VarC46 w.t. и VarC46 mut из телец включения	83
2.3.3. Выделение белка VarC2 из растворимой фракции	84
2.3.4. Постановка вертикального электрофореза в полиакриламидном геле	84
2.3.5. Исследование рибонуклеазной активности	86
2.3.6. Исследование шаперонной активности белка VarC2 с использованием β -галактозидазы.....	87
2.3.7. Исследование шаперонной активности белка VarC2 с использованием люциферазы светлячка <i>Photinus pyralis</i>	89

2.4. Биоинформатический анализ	91
2.5. Статистическая обработка результатов	91
Глава 3. Результаты и обсуждение	92
3.1. Исследование стресс-адаптивных функций модуля <i>varBC46 M. tuberculosis</i>	92
3.1.1. Биоинформатический анализ влияния мутации в гене <i>varC46</i> на функцию кодируемого им токсина	92
3.1.2. Биоинформатический анализ влияния мутации C ₁₁₃ G <i>varC46</i> на структуру токсина VarC4692	
3.1.3. Анализ влияния гена <i>varC46</i> в составе вектора pKW08-MCS-Int и его мутантного варианта на рост клеток-трансформантов <i>M. smegmatis</i>	93
3.1.4. Оценка влияния гена <i>varC46</i> дикого типа и его мутантного варианта на лекарственную чувствительность <i>M. smegmatis</i>	94
3.1.5. Исследование влияния <i>varC46</i> на рост и выживаемость трансформантов <i>M. smegmatis</i> в условиях окислительного стресса.....	97
3.1.6. Анализ влияния мутации в гене <i>varC46</i> на рост трансформантов <i>M. smegmatis</i> в условиях лимитирования источников азота и углерода	104
3.1.7. Выделение белка VarC46 дикого типа и его мутантного варианта для определения РНКазной активности.....	107
3.1.8. Оценка влияния мутации на РНКазную активность белка VarC46.....	110
Заключение к разделу 3.1.....	111
3.2. Исследование стресс-адаптивных функций модуля <i>varBC2 M. smegmatis</i>	115
3.2.1. Анализ влияния модуля <i>varBC2</i> на рост клеток <i>M. smegmatis</i> в отсутствие стрессовых воздействий	115
3.2.2. Анализ влияния модуля <i>varBC2</i> на чувствительность клеток <i>M. smegmatis</i> к антибиотикам	116
3.2.3. Анализ влияния модуля <i>varBC2 M. smegmatis</i> на рост и выживаемость в условиях окислительного стресса	117
3.2.4. Биоинформатический анализ предполагаемых взаимодействий компонентов системы ТА VarBC2 с другими клеточными белками	121
3.2.5. Анализ влияния модуля <i>varBC2</i> на уровень экспрессии генов <i>MSMEG_6764</i> , <i>MSMEG_5244</i> и <i>MSMEG_3944</i>	122
3.2.6. Анализ влияния модуля <i>varBC2 M. smegmatis</i> на рост в средах с минимальным содержанием глицерина	124
3.2.7. Выделение белка VarC2 для дальнейшей оценки его РНКазной и шаперонной активности	126
3.2.8. Оценка РНКазной активности белка VarC2.....	127
3.2.9. Определение шаперонной активности белка VarC2 с использованием β -галактозидазы	128
3.2.10. Определение шаперонной активности белка VarC2 с использованием люциферазы светлячка	129
Заключение к разделу 3.2.....	130
Заключение.....	133
Выводы	135
Список сокращений	136
Список терминов.....	137

Список литературы	138
Благодарности	158

Введение

Актуальность темы исследования

Системы токсин-антитоксин (ТА) представляют собой оперон, состоящий, как правило, из двух генов, один из которых кодирует токсин, а другой – его антагонист, антитоксин [Sala A. *et al.*, 2014; Le Roux, *et al.*, 2020].

Системы токсин-антитоксин играют важную роль в регуляции роста и деления бактериальных клеток [Unterholzner S.J. *et al.*, 2013]. В нормальных условиях роста антитоксин подавляет активность токсина [Hayes *et al.*, 2014; Walling, Butler, 2019]. Активация систем ТА при воздействии стрессовых факторов различной природы может привести к переходу бактерий из активной фазы роста в дормантное (покоящееся) состояние, для которого характерно выраженное замедление метаболических процессов, а также практически полное прекращение клеточных делений [Gupta *et al.*, 2017; Boldrin *et al.*, 2020]. Наиболее часто исследуемыми факторами стресса являются воздействие антибиотиков, недостаток соединений азота или углерода, а также окислительный стресс. Кроме того, в дормантном состоянии бактериальные клетки становятся невосприимчивыми (толерантными) к действию большинства известных антимикробных агентов. Это является одной из вероятных причин возникновения персистирующих форм патогенных бактерий, которые при прекращении стрессовых воздействий способны вернуться в метаболически активное состояние, что может привести к реактивации заболевания [Wood T.K., 2016; Wainwright *et al.*, 2021].

В настоящее время известно около 10000 предполагаемых модулей токсин-антитоксин [Kamruzzaman *et al.*, 2021]. В зависимости от механизма взаимодействия токсина и антитоксина, системы ТА делятся на 8 типов [Srivastava *et al.*, 2021]. Наиболее распространёнными являются системы ТА II типа, в которых взаимодействие осуществляется между белками токсина и антитоксина [Sala *et al.*, 2014]. В геномах различных видов бактерий содержится разное число генов, кодирующих системы токсин-антитоксин [Srivastava *et al.*, 2021]. Значительное число модулей зафиксировано в геноме *M. tuberculosis* (93), подавляющее большинство которых относится ко II типу [Zhang *et al.*, 2022]. Системы ТА *M. tuberculosis* объединены друг с другом в разветвлённую сеть, функционирование которой играет важную роль в адаптации патогена к стрессовым воздействиям, возникающим при инфицировании организма-хозяина [Tandon *et al.*, 2019]. Наиболее распространённым семейством токсинов II типа является VarC (от virulence associated protein). Токсины данного семейства обладают широкой субстратной специфичностью и способны осуществлять деградацию как тРНК, так и мРНК и рРНК бактериальной клетки [Sharrock *et al.*, 2018], тем самым, изменяя транскрипционный профиль в ответ на стрессовые воздействия [Ramage *et al.*, 2009]. Несмотря на многочисленность модулей ТА в геноме *M.*

tuberculosis, можно выделить несколько ключевых систем ТА, от активности которых зависит функционирование всей сети [Gupta et al., 2017]. Компоненты таких модулей могут рассматриваться в качестве перспективных биомишеней [Shur et al., 2016]. Предполагается, что модуль *varBC46* (*Rv3384c-Rv3385c*) является ключевым регулятором других систем токсин-антитоксин *M. tuberculosis*, экспрессия которого активируется в ответ на стрессовые воздействия различной природы, в том числе и на воздействие антибиотиков [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 *varC46* 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 VarC46.

У *M. smegmatis* – модельного объекта для *M. tuberculosis* - обнаружено 8 пар систем токсин-антитоксин II типа [Zhang et al., 2022]. VarBC2 - малоизученный член семейства ТА *M. smegmatis* [Bajaj et al., 2016]. Система токсин-антитоксин VarBC2 является вторым представителем семейства VarBC у *M. smegmatis* с полученной методом рентгеноструктурного анализа 3D структуры белка токсина. Интересен тот факт, что, помимо свойственного системам VarBC PIN-домена и РНКазной активности, VarC2, предположительно, может регулировать активность шаперонного белка DnaK [Bajaj et al., 2016]. Кроме того, было обнаружено, что белки VarC2 (MSMEG_6760) и VarB2 (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, участвующий в регуляции перехода бактерии в состояние покоя (ключевой регулятор адаптации *M. tuberculosis* к гипоксии при нахождении бактерий внутри макрофагов). Поэтому наиболее высокие уровни экспрессии оперона *Rv2034-Rv2035* отмечаются у антибиотико-резистентных персистирующих бактерий *M. tuberculosis* [Keren et al., 2011]. В связи с вышеперечисленными особенностями данная система токсин-антитоксин *M. smegmatis* представляет особый интерес для изучения с целью выяснения возможных механизмов перехода клеток в дормантное состояние и формирования антибиотикотолерантности.

Таким образом, в рамках представляемой работы осуществлены исследования двух наиболее интересных, на наш взгляд, модулей ТА класса VarBC: из возбудителя туберкулёза *M. tuberculosis* и из модельного объекта *M. smegmatis*.

Степень разработанности темы исследования

В более ранних работах были получены трёхмерные структуры белков антитоксина VarB46 и токсина VarC46, осуществлена оценка рибонуклеазной активности токсина VarC46 и определены сайты связывания антитоксина VarB46 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 VarC46.

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 [Vajaj et al., 2016]. Экспериментальные данные по изучению функциональной активности токсина VarC2 отсутствуют. Кроме того, в предыдущих работах было показано, что сверхэкспрессия гена *varB2* 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.

Целью данной работы является исследование стресс-адаптивных функций модулей ТА *varBC2 M. smegmatis* и *varBC46 M. tuberculosis* на модельной системе *M. smegmatis*.

Задачи:

1. Оценить влияние гена *varC46* в составе вектора pKW08-MCS-Int и его мутантного варианта *varC46* (C₁₁₃G) на рост культуры *M. smegmatis* в нормальных условиях.
2. Проанализировать влияние гена *varC46* w.t. и *varC46* (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 ($\Delta varB2$), токсина ($\Delta varC2$) и целого модуля ТА ($\Delta varBC2$), а также дополнительные копии гена антитоксина ($2*varB2$) и токсина ($2*varC2$) 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 *varBC2 M. smegmatis* в регуляции метаболизма глицерина.
6. Провести клонирование генов *varC2*, *varC46 w.t.* и *varC46 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 *VapC2 M. smegmatis* обладает РНКазной активностью.
4. Система ТА *VapBC2* участвует в регуляции роста *M. smegmatis* в условиях недостаточного содержания глицерина.

Степень достоверности и апробация результатов

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 *vapBC2 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.

Часть работы, посвящённая исследованию системы ТА *VapBC2 M. smegmatis*, выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-34-90124 от 20.08.2020 «Исследование функции системы токсин-антитоксин *VapBC2 Mycolicibacterium smegmatis*: РНКазная и шаперонная активность, участие в устойчивости к антибиотикам».

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

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. **Н. И. Акимова**, О. Б. Беккер, В. Н. Даниленко. Функциональная значимость модуля токсин–антитоксин *Mycolicibacterium 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.

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Современные представления о системах ТА у бактерий

1.1.1. Многообразие систем токсин-антитоксин у прокариот

Система токсин-антитоксин представляет собой оперон, в котором один из генов кодирует токсин, а другой – соответствующий ему антитоксин [Gupta A. *et al.*, 2017; Klimina *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2021]. Гены систем ТА могут быть локализованы как в бактериальных хромосомах, так и в плазмидах [Демидёнок, Гончаренко, 2013; Fraikin *et al.*, 2020]. Токсин является стабильным [Kamruzzaman *et al.*, 2021], в то время как антитоксин крайне нестабилен и быстро разрушается в условиях стрессовых воздействий [Unterholzner *et al.*, 2013] или при утрате плазмиды, несущей гены систем ТА [Singh *et al.*, 2021].

В нормальных условиях роста антитоксин взаимодействует с токсином, подавляя его активность [Sala A. *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2021]. В условиях воздействия стрессовых факторов среды происходит быстрое разрушение антитоксина и последующая активация токсина [Deter S. *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2018]. К стрессовым факторам, приводящим к деградации антитоксина, относятся: недостаток питательных соединений, инфекция бактериофагами [Singh *et al.*, 2021], утрата плазмиды с генами, кодирующими антитоксин [Sala A. *et al.*, 2014], атаки иммунной системы организма-хозяина [Lee K.U, Lee B. J., 2016], окислительный стресс и действие высоких температур [Kang *et al.*, 2018]. Кроме того, было показано, что к активации экспрессии некоторых модулей ТА (*vapBC2* и *phd/doc*) приводит воздействие таких антибиотиков, как канамицин и офлоксацин [Шур К.В., 2017]. Активный токсин способен воздействовать на различные процессы, протекающие в бактериальной клетке, среди которых: репликация ДНК, трансляция [Kang *et al.*, 2018], транскрипция, формирование цитоскелета [Singh *et al.*, 2021], синтез клеточной стенки [Mruk I., Kobayashi I., 2014], деление клетки [Sala A. *et al.*, 2014], синтез АТФ [Yamaguchi Y *et al.*, 2011], а также поддержание целостности клеточной мембраны [Kamruzzaman *et al.*, 2021].

Кроме того, токсин способен останавливать рост бактериальных клеток и обеспечивать их переход в покоящееся состояние, что позволяет им адаптироваться к неблагоприятным условиям среды [Walling K.R. *et al.*, 2016; Soo V. W. C. *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2018]. При этом накопление в бактериальных клетках высоких концентраций активного токсина способно привести к их гибели [Yamaguchi Y *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2018].

Благодаря использованию различных биоинформатических подходов в настоящее время идентифицировано более 10000 предполагаемых модулей ТА [Kamruzzaman *et al.*, 2021]. Несмотря на широкое распространение среди прокариот, гомологи генов систем ТА не были обнаружены в секвенированных эукариотических геномах [Sala A. *et al.*, 2014]. Исключение

составляет простейшее *Leishmania donovani*, в геноме которого обнаружен ген, кодирующий белок, подобный прокариотическому токсину Zeta [Srivastava et al., 2021]. Несмотря на отсутствие генов систем ТА в подавляющем большинстве видов эукариотических организмов, токсин способен влиять на различные процессы в эукариотической клетке [Sala et al., 2014]. В частности, было показано, что токсины патогенных бактерий при попадании в эукариотические клетки могут ингибировать их рост [Germain et al., 2013], а в отдельных случаях способны индуцировать гибель эукариотических клеток за счёт активации процесса апоптоза [Germain et al., 2013; Masuda et al., 2017; Srivastava et al., 2021]. Возможно, причиной данного явления является наличие некоторого сходства в процессах транскрипции и трансляции у прокариот и эукариот [Germain et al., 2013; Chan et al., 2016].

Несмотря на значительное разнообразие, некоторые системы ТА обладают рядом общих свойств [Lee et al., 2016]. Одним из ключевых признаков, на которых основывается классификация систем ТА, является структура антитоксина и механизм ингибирования им токсина [Kamruzzaman et al., 2021]. На основании данного подхода к классификации выделяют 8 типов систем ТА [Srivastava et al., 2021].

1.1.1.1. Системы ТА I типа

Антитоксин представляет собой малую некодирующую РНК (нкРНК) длиной 50-200 п.н., токсин – небольшой гидрофобный белок (20-65 а.о.) [Srivastava et al., 2021]. В отличие от систем ТА других типов, гены, кодирующие токсин и антитоксин I типа, транскрибируются независимо со своих собственных промоторов [Lee K.Y., Lee B.J., 2016]. Некодирующая РНК антитоксина является антисмысловой для мРНК токсина и может транскрибироваться как с гена, перекрывающегося с геном токсина (цис-нкРНК), так и с неперекрывающегося или частично перекрывающегося участка (транс-нкРНК) [Sarpong et al., 2021]. При нормальных условиях роста осуществляется комплементарное взаимодействие нкРНК антитоксина с мРНК токсина [Peltier et al., 2020], за счёт которого происходит либо индукция деградации мРНК токсина [Srivastava et al., 2021], либо ингибирование трансляции мРНК токсина в белок [Lecomte et al., 2021]. При стрессовых воздействиях осуществляется деградация нкРНК за счёт клеточных РНКаз, что, в свою очередь, создаёт возможность для трансляции мРНК токсина в белок [Srivastava et al., 2021] (Рисунок 1.1.1.1.1).

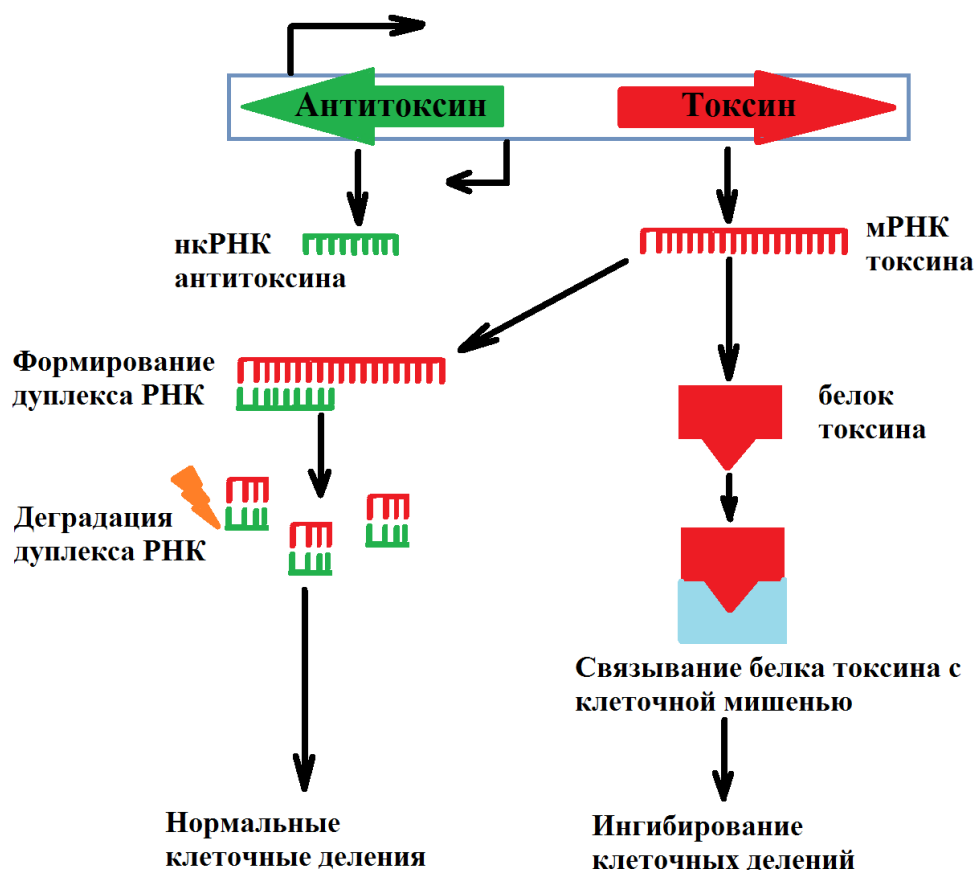


Рисунок 1.1.1.1.1. Системы ТА I типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021]

Большинство токсинов I типа представляют собой малые гидрофобные белки с трансмембранным α -спиральным доменом, образующие поры в клеточной мембране, что приводит к её деполяризации, нарушению синтеза АТФ и, как следствие, к гибели клетки [Klimina et al., 2017]. Примерами систем ТА с подобным механизмом действия являются TisB/IstR и Sok/Hok у *Escherichia coli* [Sarpong et al., 2021]. Кроме мембран-ассоциированных, существуют цитоплазматические токсины I типа, оказывающие своё летальное воздействие на бактериальные клетки либо за счёт рибонуклеазной активности (участвуют в деградации клеточных мРНК, препятствуя их трансляции в белки) [Srivastava et al., 2021], либо за счёт участия в конденсации нуклеоида [Weaver, 2020; Sarpong et al., 2021]. Примерами таких систем ТА являются SymRE у *E. coli* [Han and Lee, 2020] и RalRA у *Enterococcus faecalis* [Sarpong et al., 2021].

1.1.1.2. Системы ТА II типа

Взаимодействие осуществляется между белками – токсином и антитоксином [Kamruzzaman et al., 2021] (Рисунок 1.1.1.2.1.). Гены, кодирующие токсин и антитоксин, организованы в оперон, в котором ген антитоксина, как правило, располагается перед геном

токсина [Srivastava et al., 2021]. Тем не менее, описаны некоторые исключения, при которых ген токсина локализован перед геном антитоксина – так называемая обратная генетическая структура (системы TA MqsAR, HicAB, HigAB и RnlAB) [Fraikin et al., 2020]. Как правило, антитоксины II типа состоят из двух доменов: С-концевого домена, участвующего в связывании белка токсина, и N-концевого, ДНК-связывающего домена, участвующего в регуляции экспрессии генов модуля ТА [Chan et al., 2016]. В нормальных условиях роста происходит накопление высоких концентраций белка антитоксина, который связывается с белком токсина, образуя с ним комплекс [Harms et al., 2018]. Это приводит к инактивации токсина [Lee, 2016]. При стрессовых воздействиях активируются клеточные протеазы – Clp и Lon [Sala et al., 2014], которые разрушают антитоксин, что приводит к высвобождению белка токсина и его последующей активации [Srivastava et al., 2021].

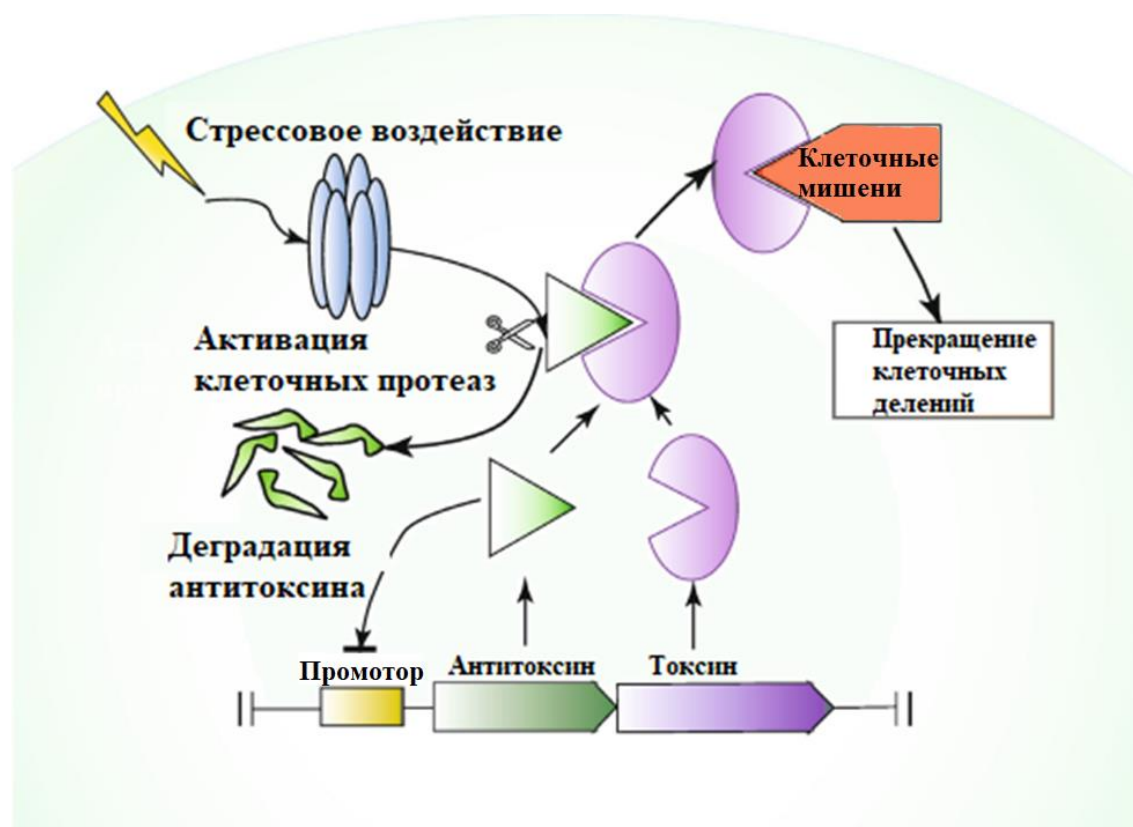


Рисунок 1.1.1.2.1. Механизм функционирования систем ТА II типа [Адаптировано из Zhang et al., 2020].

Токсины II типа обладают различными видами молекулярной активности (РНКазной, киназной, ацетилтрансферазной) [Zhang et al., 2020] и способны воздействовать на различные мишени бактериальной клетки: синтез клеточной стенки [Yang et al., 2017], репликация ДНК [Sala et al., 2014], трансляция [Unterholzner S. et al, 2013].

Системы ТА II типа являются наиболее распространённой и обширной группой [LeRoux et al., 2020]. Они распределены неравномерно, число модулей ТА в геноме варьирует в зависимости от видовой принадлежности бактериальной клетки [Zhang et al., 2020] (Таблица 1.1.1.2.1).

Таблица 1.1.1.2.1. Распределение предполагаемых систем ТА II типа в различных прокариотических геномах с помощью программы TAFinder (Zhang et al., 2020).

Штамм	Число систем ТА II типа
<i>E.coli K-12</i>	31
<i>S. typhimurium strain SL1344</i>	27
<i>Bacillus subtilis</i>	8
<i>Streptococcus pneumoniae R6</i>	6
<i>Staphylococcus aureus N315</i>	4

На основании результатов эволюционного анализа было сделано предположение о том, что системы ТА II типа передаются между бактериальными геномами за счёт горизонтального переноса генов [Goeders et al., 2014], и данная особенность, вероятно, является причиной столь широкой распространённости и значительного числа модулей ТА в геномах некоторых бактерий [Zhang et al., 2020].

Системы ТА II типа характеризуются значительным разнообразием [Sala et al., 2014]. В настоящее время внутри систем ТА II типа на основании структурного сходства токсинов выделяют 9 суперсемейств: ParE/RelE, MazF, HicA, VarC, HipA, FicT/Doc, AtaT/TacT, Zeta, MbcT [Zhang et al., 2020].

Одним из наиболее крупных является суперсемейство токсинов VarC [Frampton et al., 2012]. Для токсинов VarC характерно наличие PIN-домена [Zhang et al., 2020]. PIN-домен (PilT N-terminal domain, или N-концевой домен белка тянущей подвижности пилей IV типа) состоит из пяти β -листов, чередующихся с семью α -спиралями (укладка Россмана) [Matelska et al., 2017, Jurenas et al., 2020]. В активном сайте таких белков содержатся ионы двухвалентных металлов (Mg^{2+} или Mn^{2+}), образующие координационные связи с аминокислотными остатками [Garforth et al., 2001]. Токсины суперсемейства VarC обладают рибонуклеазной активностью [Демидёнок и др., 2014]. Как правило, токсины VarC расщепляют инициаторную тРНК, что нарушает процесс

синтеза белка и приводит к ингибированию роста [Zhang et al., 2020]. Кроме того, существуют токсины VarC, мишенями которых являются мРНК и рРНК [Matelska et al., 2017].

Другой значительной группой систем ТА II типа является суперсемейство MazF [Hayes et al., 2014]. Для токсинов MazF характерно наличие коровой структуры, состоящей из семи изогнутых антипараллельных β -листов, окружённых тремя α -спиралями [Zhang et al., 2020]. Токсин MazF является сайт-специфичной рибонуклеазой, которая деградирует как свободные мРНК, так и мРНК, ассоциированные с рибосомой, что приводит к ингибированию синтеза белка [Hayes et al., 2014]. При этом субстратная специфичность MazF варьирует в зависимости от вида [Han et al., 2020]. В состав суперсемейства MazF также входит токсин CcdB, который обладая сходной структурой, воздействует на иные клеточные мишени [Zhang et al., 2020]. Токсин CcdB является ингибитором ДНК-гиразы – фермента, вносящего отрицательные супервитки в бактериальную ДНК, что, в свою очередь, приводит к нарушению ключевых клеточных процессов: репликации, транскрипции и деления клеток [Hayes et al., 2014].

Характерной особенностью токсинов суперсемейства RelE является наличие RelE-подобной структуры, состоящей из трёх α -спиралей и пяти β -листов [Takagi et al. 2005]. Несмотря на общность молекулярной структуры, функции токсинов семейства RelE значительно отличаются [Zhang et al., 2020]. Например, токсины ParE являются ингибиторами ДНК-гиразы [Демидёнок и др., 2014], приводящими к накоплению в бактериальной ДНК повреждений, в то время как токсины RelE проявляют рибосом-зависимую мРНК-рибонуклеазную активность [Hayes et al., 2014].

Токсины суперсемейства HicA обладают структурой, подобной домену, связывающему двуцепочечную РНК – три β -листа, перед которыми расположены две α -спирали [Zhang et al., 2020]. HicA является неспецифичной рибонуклеазой [Han et al., 2020], которая деградирует мРНК, что приводит к ингибированию бактериального роста [Zhang et al., 2020].

Структура токсинов суперсемейства HipA в высшей степени сходна с CDK2 циклин-А-киназой человека [Zhang et al., 2020]. Токсины HipA обладают серин-треониновой киназной активностью и участвуют в фосфорилировании глутамил-тРНК-синтетазы, что ассоциировано с персистенцией в условиях воздействия антибиотиков [Germain et al., 2013].

Токсины суперсемейства Fic/Dos содержат Fic-домены, активный сайт которых состоит из шести α -спиралей [Stanger et al. 2016]. Токсины из данного семейства функционируют либо как аденилазы, осуществляющие перенос остатков аденозинмонофосфата на белки-мишени (FicT) [Harms et al. 2018], либо как киназы, осуществляющие фосфорилирование фактора элонгации трансляции (Doc) [Демидёнок и др., 2014].

Структурными особенностями токсинов из суперсемейства AtaT является наличие семи β -листов, связанных с четырьмя α -спиралями. Токсины AtaT – ацетилтрансферазы, осуществляющие перенос ацетильных групп на белки-мишени [Jurenas et al. 2019].

Токсины семейства Zeta состоят из шести центральных β -листов, окружённых несколькими α -спиралями [Zhang et al., 2020]. Токсины Zeta являются УДФ-N-ацетилглюкозамин-киназами (уридин-дифосфат-N-ацетилглюкозамин-киназами), которые ингибируют синтез клеточной стенки [Srivastava et al., 2021]. Механизм ингибирования заключается в фосфорилировании УДФ-N-ацетилглюкозамина – субстрата, с которого начинается синтез клеточной стенки микобактерий [Alderwick et al., 2015].

Сравнительно недавно было описано суперсемейство MbcT, включающее в себя токсины с АДФ-рибозилтрансферазной активностью [Freire et al. 2019]. Структурными особенностями токсинов данного семейства является укладка в виде «сэндвича», при которой шесть β -листов чередуются с девятью α -спиралями [Skjerning et al. 2019]. Воздействие активного токсина MbcT приводит к снижению уровня внутриклеточного НАД, и, как следствие, к гибели бактериальной клетки [Zhang et al., 2020].

1.1.1.3. Системы ТА III типа

Антитоксин представляет собой малую некодирующую РНК, которая связывается непосредственно с белком токсина [Kamruzzaman et al., 2021]. Гены, кодирующие токсин и антитоксин, организованы в бицистронный оперон с общим промотором [Srivastava et al., 2021]. Ген антитоксина состоит из множества tandemных повторов, за которыми локализована короткая палиндромная последовательность, играющая роль терминатора транскрипции [Blower et al., 2012]. За счёт данной палиндромной последовательности осуществляется регуляция соотношения токсин-антитоксин [Srivastava et al., 2021]. За геном антитоксина располагается ген токсина [Blower et al., 2012]. При благоприятных условиях роста РНК антитоксина связывается с белком токсина, формируя с ним комплекс токсин-РНК-псевдоузел, в котором активность белка токсина ингибируется [Coray et al., 2017] (Рисунок 1.1.1.3.1.).

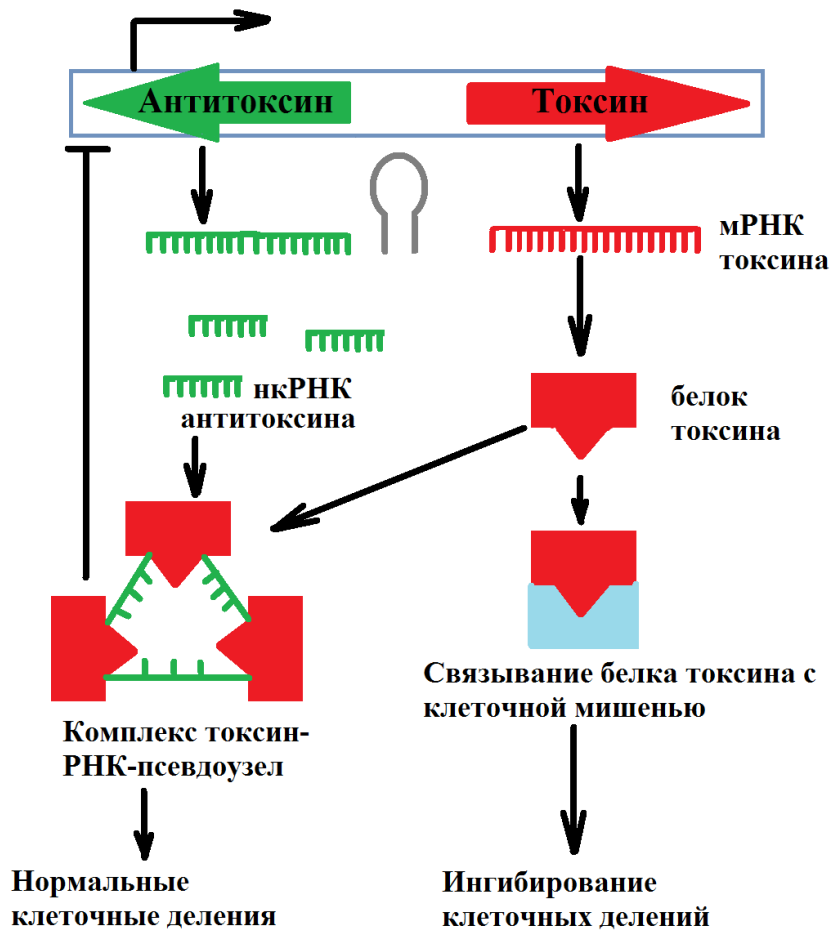


Рисунок 1.1.1.3.1. Системы ТА III типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021]

Токсины III типа являются рибонуклеазами, осуществляющими деградацию мРНК бактериальной клетки при стрессовых воздействиях [Srivastava et al., 2021]. Первой идентифицированной системой ТА III типа был плазмидный модуль ТА *toxIN* у *Pectobacterium atrosepticum* [Song et al., 2020], где *ToxN* - токсин, а *ToxI* - антитоксин, образующий гексамерный комплекс с тремя белками токсина *ToxN* [Blower et al., 2012].

1.1.1.4. Системы ТА IV типа

Токсин и антитоксин являются белками, однако они не взаимодействуют друг с другом, а конкурируют за связывание с одной и той же клеточной мишенью [Kamruzzaman et al., 2021]. Примерами таких систем ТА являются *YeeUV* у *E. coli* [Song et al., 2020]. Токсин *YeeV* связывается с белками цитоскелета *Ftz* и *Mre* и ингибирует их полимеризацию, что, в свою очередь, приводит к прекращению клеточных делений [Lee, 2016] (Рисунок 1.1.1.4.1.).

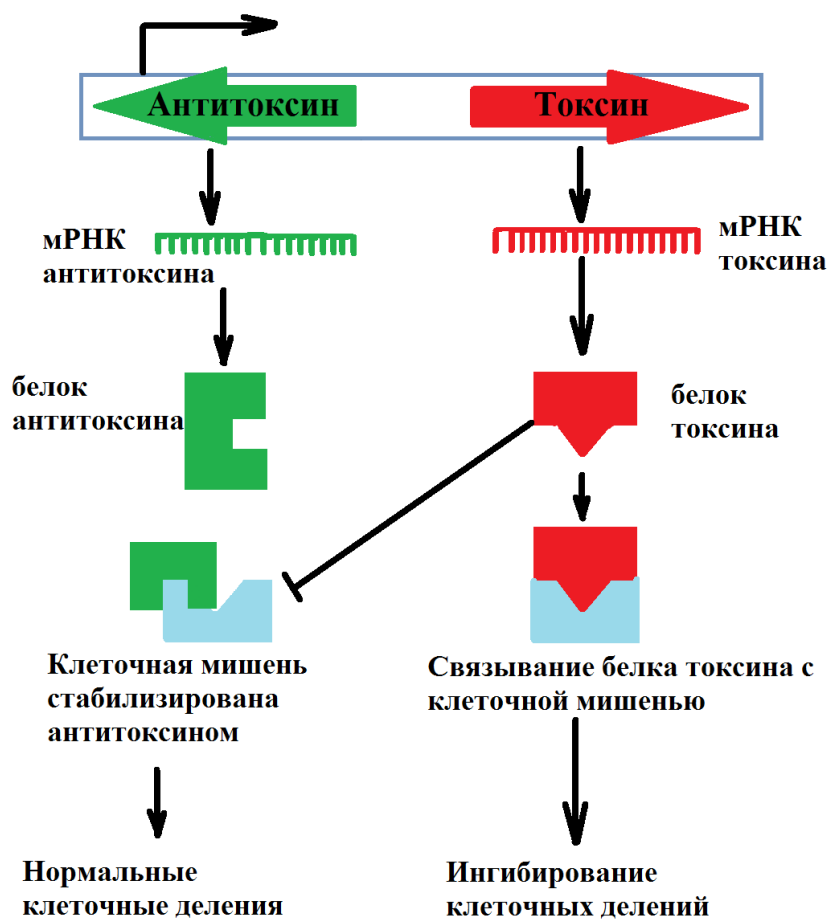


Рисунок 1.1.1.4.1. Системы ТА IV типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021]

При нормальных условиях роста антитоксин YeeU ингибирует действие токсина YeeV, связываясь с белками Ftz и Mre и стабилизируя их [Srivastava et al., 2021].

1.1.1.5. Системы ТА V типа

В системах этого типа взаимодействие осуществляется между мРНК токсина и белком антитоксина [Kamguzzanam et al., 2021]. При этом антитоксин обладает рибонуклеазной активностью, за счёт которой осуществляется деградация мРНК токсина, что препятствует её трансляции в белок (Рисунок 1.1.1.5.1.) [Deter H. S. et al., 2017].

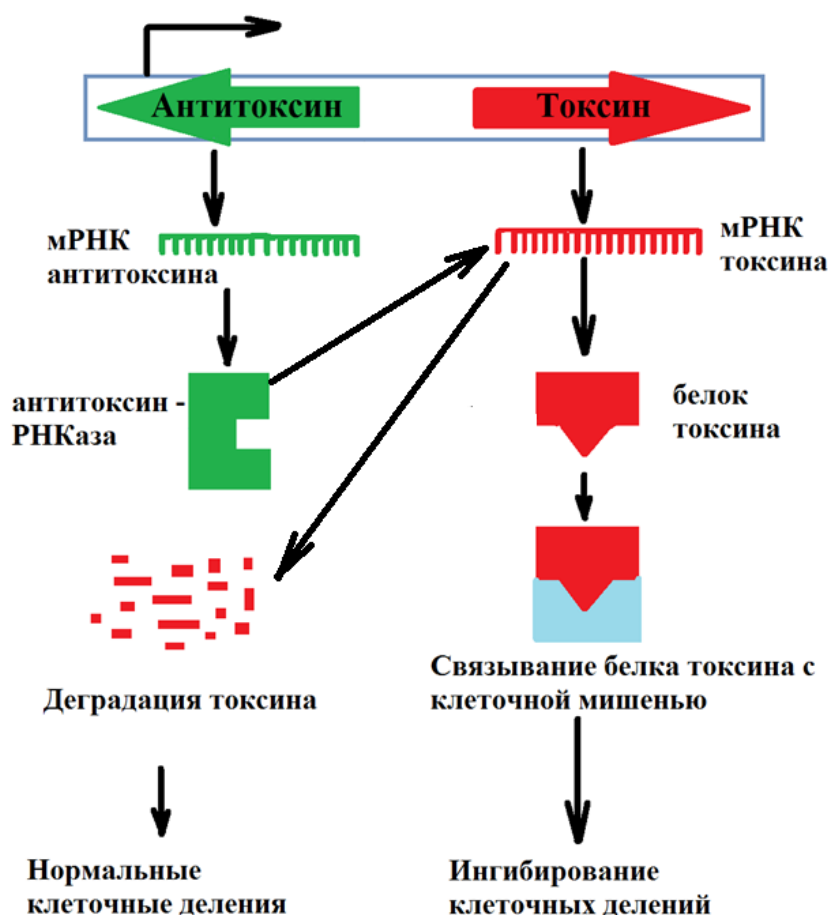


Рисунок 1.1.1.5.1. Системы ТА V типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021].

Примером системы ТА V типа является модуль *ghoST* у *E. coli* [Wang et al., 2012]. При благоприятных условиях роста стабильный белок антитоксина – GhoS, представляющий собой сайт-специфическую рибонуклеазу [Lee, 2016], расщепляет мРНК токсина GhoT в сайтах, богатых основаниями А или U [Srivastava et al., 2021], тем самым ингибируя её трансляцию в белок [Unterholzner S. J. et al., 2013]. Стрессовые воздействия приводят к активации клеточных протеаз, которые расщепляют белок антитоксина [Song et al., 2020]. Также деградация GhoS при неблагоприятных условиях роста может осуществляться на уровне мРНК, за счёт активации токсина II типа MqsR [Srivastava et al., 2021]. Деградация антитоксина GhoS способствует трансляции токсина GhoT в функциональный белок [Wang et al., 2011]. Активный токсин GhoT участвует в индукции лизиса бактериальных клеток, не сопровождающегося повреждением мембраны [Srivastava et al., 2021].

1.1.1.6. Системы ТА VI типа

Взаимодействие осуществляется между белками токсина и антитоксина [Kamruzzaman et al., 2021]. Антитоксин является протеазным адаптером, который направляет токсин к протеазе, осуществляющей его протеолиз (Рисунок 1.1.1.6.1.) [Kamruzzaman et al., 2021].

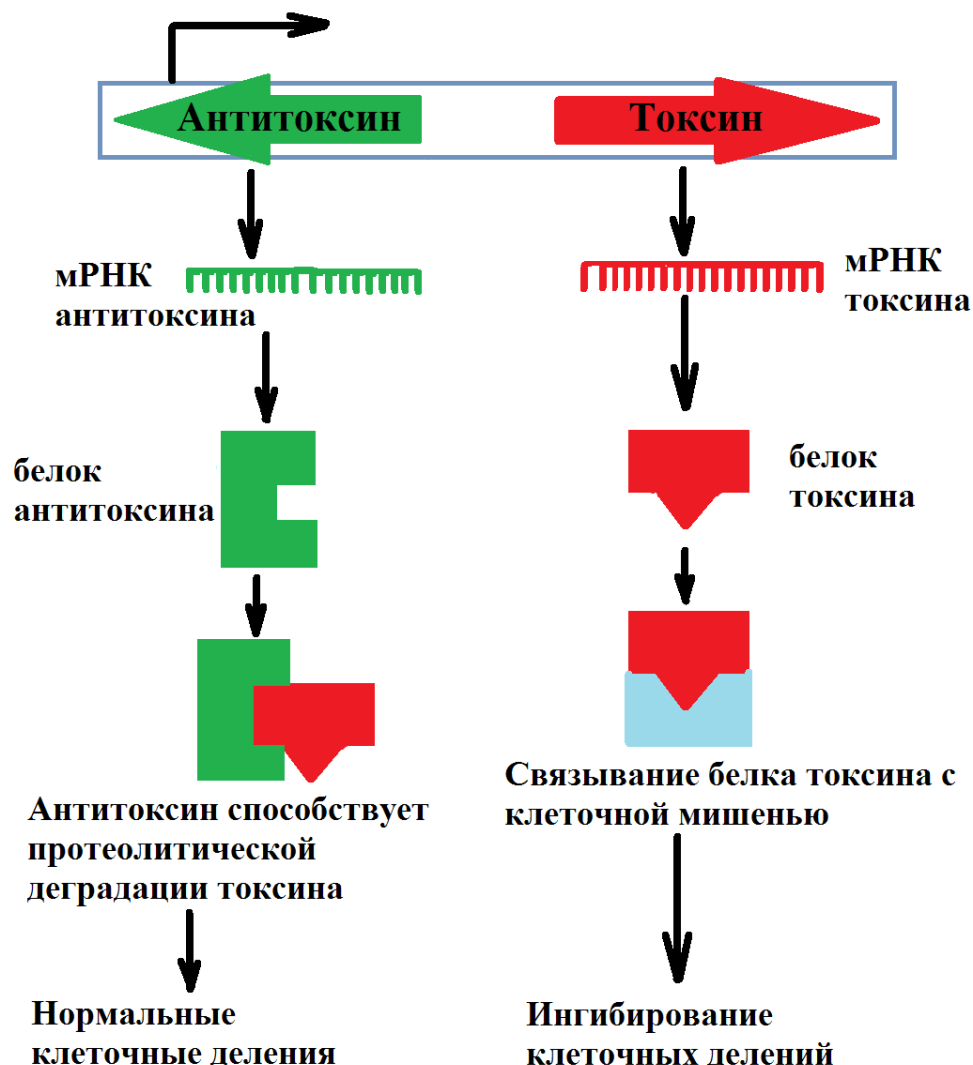


Рисунок 1.1.1.6.1. Системы ТА VI типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021].

Единственной системой ТА VI типа, известной на сегодняшний день, является SocAB у *Caulobacter crescentus* [Song et al., 2020]. Токсин SocB взаимодействует с DnaN – белком-«зажимом», участвующим в прикреплении ДНК-полимеразы к ДНК матрице, и препятствует связыванию DnaN с другими белками-«зажимами», тем самым блокируя процесс репликации [Aakre et al. 2013]. Активность SocB нейтрализуется за счёт антитоксина SocA, являющегося протеолитическим адаптером протеазы ClpXP, которая осуществляет деградацию токсина [Srivastava et al., 2021].

1.1.1.7. Системы ТА VII типа

Как и в случае систем ТА II, IV и VI типов, взаимодействующие токсин и антитоксин являются белками [Wang et al., 2020]. Однако в системах ТА VII типа антитоксин выступает в качестве фермента, участвующего в посттрансляционной модификации токсина, что приводит к утрате активности последнего [Kamruzzaman et al., 2021] (Рисунок 1.1.1.7.1.).

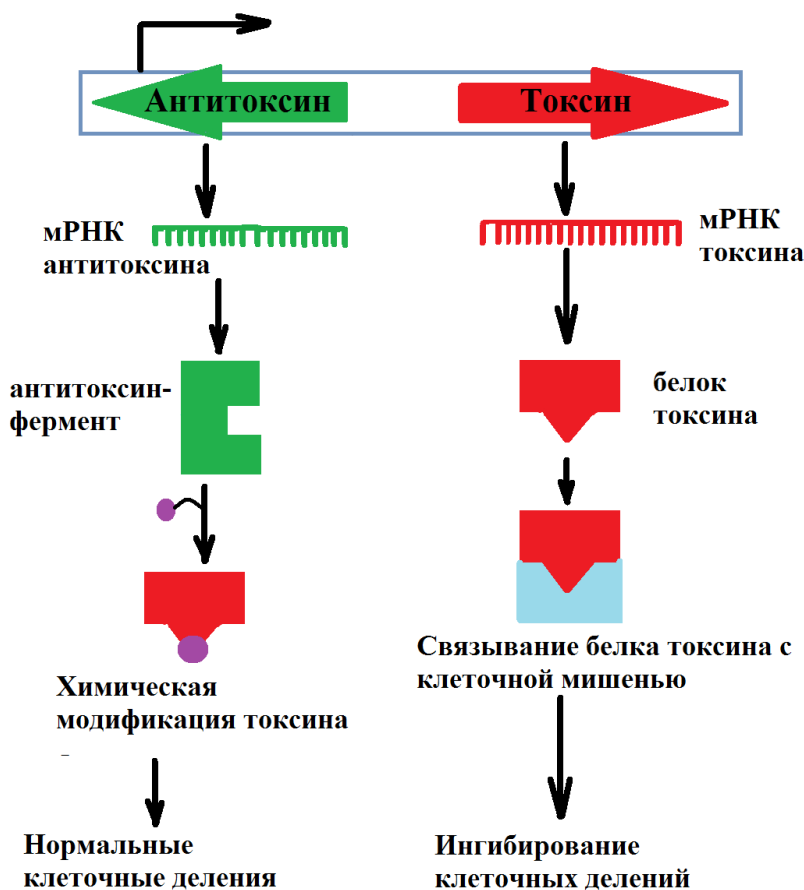


Рисунок 1.1.1.7.1. Системы ТА VII типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021].

В качестве инактивирующих химических модификаций были описаны окисление, полиаденилирование и фосфорилирование [Srivastava et al., 2021]. Например, в системе ТА HcpT/MntA у *E. coli* антитоксин MntA осуществляет полиаденилирование тирозина в 104-й позиции токсина HcpT, что приводит к утрате его активности [Yao et al., 2020]. В другой системе ТА у *E. coli* Nha/TomB антитоксин TomB нейтрализует токсин Nha путём окисления его цистеиновых остатков [Srivastava et al., 2021]. Третья система ТА VII типа - TglT/TakA - была обнаружена в геноме *M. tuberculosis* [Marimon et al. 2016]. Антитоксин TakA обладает протеинкиназной активностью и нейтрализует токсин TglT путём фосфорилирования остатков серина TglT [Srivastava et al., 2021]. Отличительной особенностью всех рассмотренных выше систем ТА VII типа является необходимость в отдельном ферменте (не кодируемом генами

модуля ТА), который осуществлял бы обратную модификацию белка токсина, приводящую к его активации в условиях стресса [Song et al., 2020]. Например, в случае токсина TgIT *M. tuberculosis*, для реактивации необходима фосфодиэстераза, удаляющая остатки фосфата, присоединённые антитоксином TakA [Wang et al., 2020].

1.1.1.8. Системы ТА VIII типа

Взаимодействующие токсин и антитоксин являются малыми РНК [Choi et al., 2018]. Примером такой системы ТА является модуль RyeA/SdsR у *E. coli* [Srivastava et al., 2021] (Рисунок 1.1.1.8.1.).

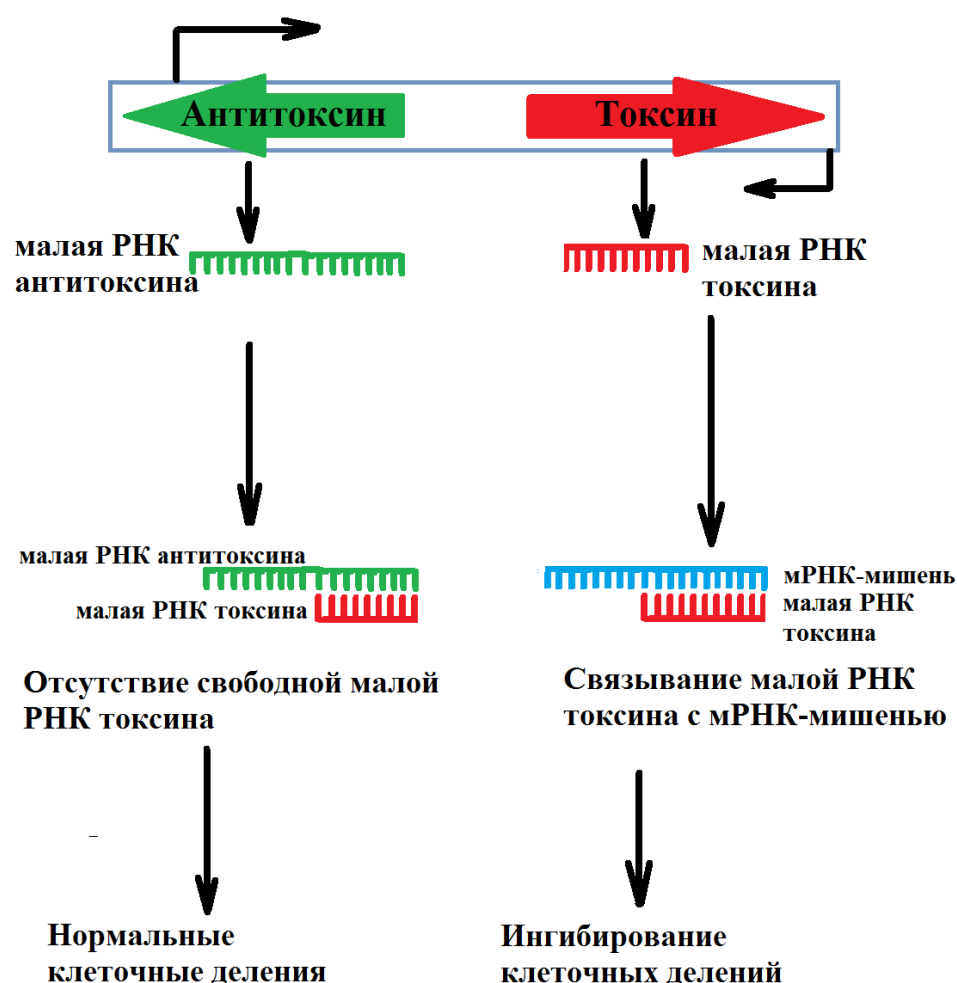


Рисунок 1.1.1.8.1. Системы ТА VIII типа [Адаптировано из Srivastava et al., 2021].

В нормальных условиях роста осуществляется связывание малой РНК антитоксина RyeA с антисмысловой малой РНК токсина SdsR, что приводит к инактивации токсина [Song et al., 2020]. При стрессовых воздействиях происходит деградация RyeA и накопление малой РНК SdsR. SdsR связывается с мРНК *yhсВ* (белок внутренней мембраны), тем самым, препятствуя её

трансляции в белок, что влияет на синтез мембраны и, в конечном счёте, может приводить к гибели бактериальной клетки [Srivastava et al., 2021].

1.1.2. Функции систем ТА II типа

Предметом наших исследований являются системы ТА II типа. Многообразие систем ТА II типа, и их широкая представленность в геномах различных видах бактерий позволяет сделать предположение относительно их значимости в физиологии бактериальных клеток [Kamruzzaman et al., 2020]. В многочисленных исследованиях показано, что системы ТА II типа выполняют ряд важнейших функций в клетках прокариот, среди которых:

1) Поддержание стабильности наследования плазмид. Многие низкокопийные плазмиды несут гены систем ТА, способствующие стабильному наследованию таких плазмид [Unterholzner et al., 2013]. Примером систем ТА, участвующих в поддержании наследования плазмид, является модуль *ccdAB* *E. coli*, локализованный в F-плазмиде [Lee et al., 2016]. Ген *ccdB* кодирует стабильный токсин, *ccdA* – нестабильный антитоксин [Kim et al., 2016]. Если после деления бактериальной клетки в дочернюю клетку попадает плаزمид с генами систем ТА, то в её цитоплазме токсин и антитоксин будут представлены в равных концентрациях, что способствует формированию комплекса токсин-антитоксин и последующей инактивации токсина [Lee et al., 2016]. Если при делении материнской клетки дочерняя не наследует плазмиду с генами ТА, то антитоксин, изначально присутствующий в цитоплазме дочерней клетки в составе комплекса с токсином, со временем будет деградирован клеточными протеазами [Kim et al., 2016]. Это приведёт к высвобождению и активации токсина [Lee et al., 2016]. Активный токсин CcdB ковалентно связывается с ДНК-гиразой и нарушает её функцию [Kamruzzaman et al., 2020]. Ингибирование ДНК-гиразы приводит к накоплению повреждений в хромосомной ДНК и, как следствие, к гибели бактериальной клетки [Lee et al., 2016]. Данный механизм получил название постсегрегационной клеточной гибели [Fraikin et al., 2020]. Кроме того, существует предположение, что поддержание стабильности наследования плазмид с участием систем ТА может обеспечиваться не только за счёт индукции гибели, но и за счёт ингибирования роста бактериальных клеток, не унаследовавших плазмиду с генами ТА [Kamruzzaman et al., 2020]. Следует подчеркнуть, что не все плазмидные системы ТА в равной степени участвуют в поддержании стабильности наследования плазмид, в которых они локализованы [Lee et al., 2016]. Данная характеристика зависит от вида бактерий, в геноме которых содержатся плазмидные модули ТА [Kamruzzaman et al., 2020].

2) Поддержание стабильности наследования генетических элементов, локализованных вне плазмид [Kamruzzaman et al., 2020]. Участие систем ТА II типа в поддержании стабильности наследования не ограничивается плазмидами, а распространяется на

неплазмидные генетические элементы, такие как геномные острова, транспозоны и интегративные конъюгативные элементы [Srivastava et al., 2021]. Так же, как и в случае плазмидных систем ТА, поддержание наследования осуществляется за счёт индукции гибели бактериальных клеток, не унаследовавших генетические элементы, за счёт накопления активного токсина [Kamruzzaman et al., 2020]. Геномные острова – участки бактериального генома, способные к горизонтальному переносу [Bordes et al., 2021]. Они в значительной степени различаются даже у близких видов и могут содержать гены, обеспечивающие селективное преимущество (например, гены вирулентности, устойчивости к антибиотикам) [Juhas et al., 2009]. Показано, что некоторые системы ТА участвуют в поддержании наследования геномных островов. Например, у *M. tuberculosis* системы ТА II типа препятствуют утрате генов вирулентности, локализованных рядом с ними, при горизонтальном переносе [Bordes et al., 2021]. Кроме того, системы ТА участвуют в стабилизации конъюгативных интегративных элементов, которые, помимо гена интегразы, содержат гены, которые кодируют белки, имеющие адаптивное значение (например, гены устойчивости к антибиотикам) [Kamruzzaman et al., 2020]. Также было выдвинуто предположение, что системы ТА участвуют в поддержании наследования мобильных генетических элементов – транспозонов, в связи с локализацией модулей ТА рядом с генами, кодирующими транспозазу и резолвазу [Lima-Mendez et al., 2020].

3) Формирование вирулентности у патогенных бактерий. Вирулентность - это количественная характеристика, определяемая минимальным числом патогенных клеток, которое необходимо для заражения организма-хозяина [Methot P.O., Alizon S., 2014]. Степень вирулентности зависит от экспрессии многих генов [Forrellad M.A. et al., 2013]. Системы ТА могут участвовать в формировании вирулентности [Georgiades K., Raoult D., 2011]. Была обнаружена взаимосвязь между числом модулей ТА и степенью вирулентности патогенных бактерий [Kamruzzaman et al., 2020]. Так, геномы патогенных видов, как правило, содержат в несколько раз больше модулей ТА, чем геномы свободноживущих микроорганизмов [Coussens N.P., Daines D.A., 2016]. Например, в геноме *M. tuberculosis* содержится более 90 модулей ТА [Bordes et al., 2021], в то время как в геноме непатогенного *M. smegmatis* – всего лишь 8 [Yu X et al., 2020]. Было показано, что делеции генов ТА приводят к выраженному снижению способности к инфицированию клеток организма-хозяина у таких бактерий, как *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae* и *M. tuberculosis* [Lobato-Marquez M. et al., 2016]. Например, делеция трёх генов, кодирующих токсины MazF3, MazF6 и MazF9, *M. tuberculosis* приводит к значительному снижению выживаемости клеток патогена при инфекции макрофагов млекопитающих [Kamruzzaman et al., 2020]. Снижение жизнеспособности таких мутантов может быть связано с повышением чувствительности к воздействию таких стрессовых факторов, как недостаток питательных веществ и окислительный стресс, что было

продемонстрировано в работе *Tiwari P. (2015)*. Предполагается, что при контакте патогена с клетками организма-хозяина инициируется деградация антитоксина, которая осуществляется за счёт действия протеаз, что приводит к высвобождению и активации токсина [Lobato-Marquez M. *et al.*, 2016]. Активный токсин способен воздействовать не только на бактериальные клетки, но и на клетки организма-хозяина [Do Vale A. *et al.*, 2016]. Например, после попадания *M. tuberculosis* в макрофаг с помощью бактериальных белков токсинов (MazF) блокируется процесс образования фагосомы, и тем самым, *M. tuberculosis* избегает гибели [Kamruzzaman *et al.*, 2020]. На данный механизм указывает наличие белка токсина MazF как в бактериальной клетке, так и в макрофагах. Вместе с тем, антитоксин MazE присутствует только в клетках *M. tuberculosis* и не обнаруживается в макрофагах [Lobato-Marquez M. *et al.*, 2016].

Кроме положительного влияния систем ТА на вирулентность, существует и отрицательное [Kamruzzaman *et al.*, 2020]. Например, хромосомный модуль ТА *Pseudomonas aeruginosa* участвует в снижении степени вирулентности данного вида [Wood *et al.*, 2016]. Активация токсина HigB приводит к ингибированию синтеза факторов вирулентности [Kamruzzaman *et al.*, 2020].

4) Формирование биоплёнок, играющих важную роль в защите патогенных бактерий от воздействия антибиотиков и иммунной системы организма-хозяина [Lee K.Y., Lee B.J., 2016]. Биоплёнки представляют собой конгломерат (сообщество), расположенное на биотических либо на абиотических поверхностях, клетки которого прикреплены друг к другу и погружены в выделяемый ими матрикс [Kamruzzaman *et al.*, 2020]. Матрикс, как правило, содержит белки (фибрин), полисахариды (альгинат), а также внеклеточную ДНК [Karimi *et al.*, 2015]. Предполагается, что биоплёнки участвуют в развитии порядка 80% хронических воспалительных и инфекционных заболеваний человека, вызванных бактериями (в т.ч. туберкулёза) [Kedzierska *et al.*, 2016]. Показано, что в образовании биоплёнок *M. tuberculosis* участвуют такие системы ТА, как VarBC43 (Rv2871-2872) [Wang *et al.*, 2018] и MazEF [Tiwari *et al.*, 2015].

5) Обеспечение устойчивости к бактериофагам. Большинство токсинов II типа является рибонуклеазами, осуществляющими деградацию мРНК в специфических сайтах [Kamruzzaman *et al.*, 2020]. Данное свойство токсинов используется бактериальными клетками для защиты от бактериофагов [Srivastava *et al.*, 2021]. Например, система ТА RnlAB *E. coli* штамма K-12 участвует в обеспечении устойчивости к бактериофагу T4 [Koga *et al.*, 2011]. Заражение клеток *E. coli* бактериофагом приводит к деградации нестабильного антитоксина RnlB с последующим высвобождением и активацией стабильного токсина RnlA [Kamruzzaman *et al.*, 2020]. Активный токсин расщепляет большинство мРНК бактериофага T4 на поздней стадии инфекции и, тем самым, препятствует его распространению [Koga *et al.*, 2011]. Ещё одна

хромосомная система TA - MazEF - защищает бактериальные клетки от заражения бактериофагами, препятствуя распространению бактериофага P1 [Alawneh et al., 2016]. В многочисленных работах было показано, что делеция MazEF способствует распространению не только бактериофага P1, но и T4 [Kamruzzaman et al., 2020].

б) Участие в регуляции ответа на стрессы различной природы. Предполагается, что модули TA могут участвовать в ответе бактериальных клеток на стресс, связанный с недостатком питательных соединений, а также на окислительный, температурный стрессы [Kamruzzaman et al., 2020]. Наиболее подробно изучено участие систем TA в ответе на окислительный стресс. В частности, достоверно было показано участие систем TA YefM-YoeB и RelBE *S. pneumoniae* в ответе клеток на воздействие перекиси водорода (H₂O₂) [Chan et al., 2018]. Делеция систем TA *yefM-yoeB* и *relBE* приводила к резкому снижению выживаемости клеток при воздействии H₂O₂ [Kamruzzaman et al., 2020]. При этом генетическая комплементация обеих систем TA приводила к восстановлению выживаемости [Chan et al., 2018].

1.1.3. Понятие о стресс-адаптивной функции

Стресс-адаптивная функция - участие в адаптации и выживании бактериальных клеток в условиях воздействия стрессовых факторов различной природы. На некоторых стадиях своего жизненного цикла бактериальные клетки сталкиваются со стрессом – состоянием, вызванным воздействиями окружающей среды, лежащими за пределами оптимальных условий для жизнедеятельности бактериальных клеток [Aldsworth et al., 1999]. По степени интенсивности стрессовые воздействия классифицируются на летальные (приводящие к гибели бактериальных клеток) и сублетальные [Aldsworth et al., 1999]. В зависимости от происхождения стрессовые воздействия (стрессовые факторы, или стрессоры) делятся на физические (воздействия низких или высоких температур), химические (низкий или высокий pH среды) и биологические (например, заражение бактериальных клеток бактериофагом) [Carozzi et al., 2009]. К числу наиболее распространённых стрессовых факторов среды, воздействующих на бактериальные клетки, относятся: недостаток питательных соединений, осмотическое давление, повышенная кислотность, окислительный стресс, экстремальные значения температуры, антимикробные соединения [Dawan, Ahn, 2022].

Наиболее наглядно воздействие совокупности стрессовых факторов различной природы наблюдается при инфицировании клетками патогена организма-хозяина [Carozzi et al., 2009]. При инфицировании человека клетки *M. tuberculosis* капельным путём попадают в лёгочные альвеолы, где они фагоцитируются альвеолярными макрофагами (Рисунок 1.1.3.1.) [Baykan et al., 2022].

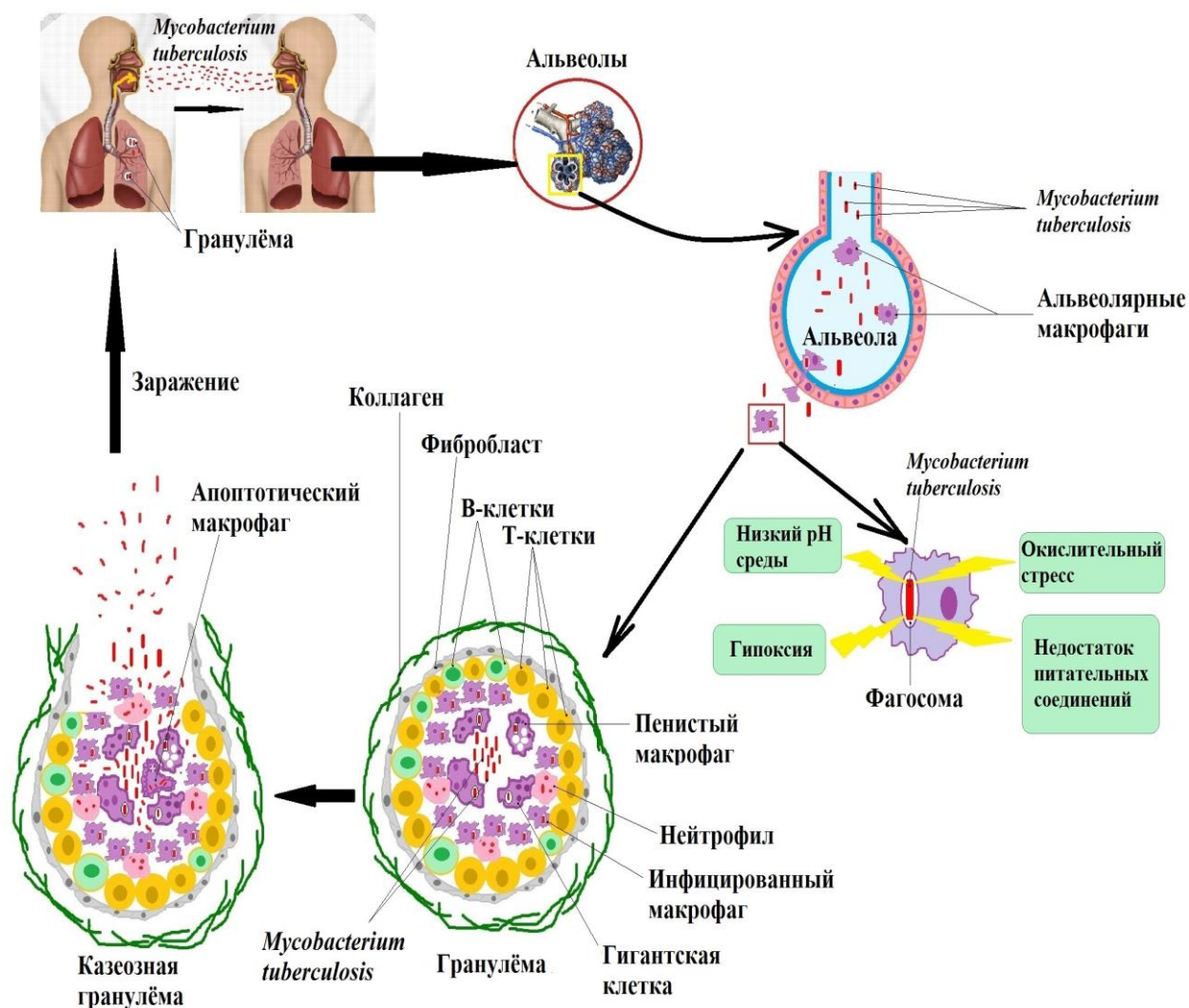


Рисунок 1.1.1.3.1. Схема цикла инфицирования *M. tuberculosis*

После поглощения макрофагами туберкулёзные бактерии попадают в фагосомальные компартменты. При интернализации в фагосому *M. tuberculosis* проявляет уникальную способность влиять на антимикробный ответ хозяина и ингибировать слияние фагосомы и лизосомы [Huang et al., 2019]. С другой стороны, макрофаги организма взаимодействуют с клетками иммунной системы, что может привести к их дальнейшей активации. В связи с этим выделяют 2 поляризационных состояния макрофагов: M1-поляризованное, или рестриктивное – состояние, при котором осуществляется активация IFN- γ и TNF- α , с последующей фенотипической трансформацией макрофагов, увеличением выработки хемокинов, цитокинов и проангиогенных факторов, способствующих уничтожению микобактерий; и M2-поляризованное, или перmissive – состояние, при котором бактериальные клетки не только не гибнут, но и сохраняют способность к активным делениям [Huang et al., 2019].

Отличительной особенностью инфекции *M. tuberculosis* является образование гранулём - организованных иммунологических структур, богатых иммунными клетками, которые скапливаются в очаге воспаления [Kundu et al., 2021]. Гранулёмы состоят из лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов (*M. tuberculosis* в основном обитает в макрофагах) [Kundu et al., 2021]. Внутри гранулём клетки *M. tuberculosis* находятся в дормантном состоянии, для которого характерно замедление метаболизма и роста [Kundu et al., 2021]. Таким образом, гранулёмами осуществляется ограничение роста и распространения *M. tuberculosis* [Rahlwes et al., 2023]. Зрелые макрофаги могут дополнительно претерпевать фенотипические изменения, сливаясь в многоядерные гигантские клетки и дифференцируясь в насыщенные липидами пенистые клетки [Huang et al., 2019]. По мере накопления клеток *M. tuberculosis* внутри гранулёмы, она становится всё более уязвимой к разрыву на более поздних стадиях инфекции, что может привести к выходу *M. tuberculosis* из цитозоля [Parbhoo et al., 2022]. Предполагается, что процесс распада гранулёмы в большей степени определяется соотношением M1/M2-поляризованных макрофагов. Иными словами, чем больше M1-поляризованных макрофагов (рестриктивное состояние), тем выше вероятность сохранения гранулёмы, препятствующей распространению инфекционного процесса [Huang et al., 2019]. В макрофагах, находящихся в рестриктивном состоянии (M1), клетки *M. tuberculosis* подвергаются воздействию макрофагальной среды с ограниченным количеством питательных веществ, где бактерии испытывают кислотный стресс, гипоксию и воздействие активных форм кислорода и азота [Chandra et al., 2022; Parbhoo et al., 2022].

Окислительный стресс является одним из ключевых стрессовых факторов, вызванных нарушением баланса между прооксидантными и антиоксидантными механизмами защиты клетки, и, как следствие, окислительными изменениями макромолекул (мембранных липидов, клеточных белков и ферментов, участвующих в репарации ДНК) [Capozzi et al., 2009]. Основными агентами, приводящими к возникновению окислительного стресса, являются активные формы азота (АФА) и кислорода (АФК) [Parbhoo et al., 2022]. Главным образом, к ним относятся гидроксил-радикал ($\bullet\text{OH}$), супероксид анион (O^{2-}), перекись водорода (H_2O_2), органический гидропероксид (ROOH), пероксинитрит (OONO) и оксид азота (NO) [Capozzi et al., 2009]. Активные формы азота и кислорода приводят к повреждениям белков, ДНК, РНК и липидов, оказывая негативное воздействие на клеточный метаболизм [Parbhoo et al., 2022]. В связи с высокой токсичностью активных форм азота и кислорода особое значение имеет развитие клеточных систем детоксификации АФА и АФК [Saini et al., 2016]. Данные защитные системы включают в себя множество ферментов, которые в зависимости от субстрата делятся на различные группы [Capozzi et al., 2009]. Например, каталаза – фермент, обнаруженный

практически у всех живых организмов, катализирует разложение перекиси водорода на кислород и воду [Smulevich et al., 2006].

Внутри макрофагов организма-хозяина *M. tuberculosis* подвергается воздействию стресса, связанного с недостатком питательных соединений [Parbhoo et al., 2022]. Недостаточное поступление переходных металлов, углерода и аминокислот в клетки *M. tuberculosis* приводит к замедлению ключевых метаболических путей и ингибированию клеточных делений, и, предположительно, вызывает переход *M. tuberculosis* к ауксотрофности [Parbhoo et al., 2022]. Под ауксотрофностью предполагается неспособность микроорганизма самостоятельно синтезировать определённые метаболиты, необходимые для его роста. Ауксотрофность по метионину [Verney et al., 2015], треонину [Hasenoehrl et al., 2019], лизину [Pavelka et al., 2003], лейцину [Hondalus et al., 2000] и аргинину [Tiwari et al., 2018] сильно ослабляет клетки *M. tuberculosis* in vivo из-за невозможности транспортировать эти метаболиты из клеток организма-хозяина. В условиях лимитирования питательных соединений активируется выработка алармона (p)ppGpp, который ингибирует синтез РНК, что способствует более экономичному расходу энергии и повышению выживаемости *M. tuberculosis* [Parbhoo et al., 2022]. *M. tuberculosis* были выработаны и другие механизмы синтеза и поглощения основных питательных веществ организма-хозяина для удовлетворения своих биоэнергетических и биосинтетических потребностей [Eisenreich et al., 2013]. Кроме того, *M. tuberculosis* дополнительно использует специфические метаболические процессы, которые облегчают адаптацию к персистенции [Swiecilo et al., 2013].

Другим стрессовым фактором, воздействующим на клетки *M. tuberculosis* внутри макрофагов, является низкий pH среды [Parnhboo et al., 2022]. Закисление фагосом представляет собой защитный механизм, используемый организмом для уничтожения патогена [Huang et al., 2019]. Хотя *M. tuberculosis* относится к микроорганизмам, чувствительным к высокой кислотности, в ходе эволюции были выработаны механизмы, способствующие выживанию патогена в условиях низкого pH среды [Dawan, Ahn, 2022]. К ним относятся поддержание оптимального внутрибактериального pH, а также нейтрализация фагосомального pH за счёт мембранных белков, протонных помп, декарбоксилирования аминокислот и модификаций клеточной стенки, а также индукция деградации V-АТФазного комплекса [Singh et al., 2019]. Оценка внеклеточного pH и регуляция ответа бактериальной клетки на его изменение играют ключевую роль в патогенезе туберкулёза [Parnhboo et al., 2022]. У *M. tuberculosis* данную функцию выполняют двухкомпонентная регуляторная система PhoPR [Sevalkar et al., 2019] и цитоплазматический сенсор окислительно-восстановительного баланса WhiB3 [Feng et al., 2018].

Гипоксия – определяющая характеристика гранулёмы, является одним из наиболее изученных механизмов, ассоциированных с переходом *M. tuberculosis* в дормантное состояние [Kundu et al., 2021]. Снижение растворённого кислорода может приводить к прекращению роста *M. tuberculosis* и переходу в нереплицирующееся персистирующее состояние на длительный период времени. При этом бактериальные клетки сохраняют способность к экспоненциальному росту, как только концентрация растворённого кислорода достигнет оптимальных значений [Kundu et al., 2021]. Согласно модели Уэйна [Wayne and Hayes, 1996], существует 2 типа нереплицирующихся персистирующих состояний. Первое наблюдается, когда степень насыщения кислородом составляет 1%. В данном состоянии бактерии перестают делиться, но концентрация АТФ в бактериальных клетках остаётся по-прежнему высокой. Переход ко второй нереплицирующейся стадии осуществляется при снижении степени насыщения кислородом до 0,06% [Wayne and Sohaskey, 2001]. Это приводит не только к прекращению клеточных делений, но и к замедлению метаболических процессов [Kundu et al., 2021].

В некоторых случаях при воздействии стрессовых факторов среды наблюдается перекрёстная защита, когда воздействие одного стрессора приводит к адаптации к воздействию другого, благодаря перекрывающимся ответам бактериальной клетки на стрессы различной природы [Carozzi et al., 2009]. Кроме того, предполагается, что ответ бактериальных клеток на стрессы различной природы может приводить не только к их адаптации, но и также способствовать развитию лекарственной устойчивости, главным образом, за счёт активации транскрипционных регуляторов, участвующих в клеточном ответе на стрессовые воздействия. Данные транскрипционные регуляторы способны активировать экспрессию транспортёров лекарств, индуцировать образование биоплёнок либо приводить к перестройкам клеточного метаболизма [Dawan, Ahn, 2022]. Исследование механизмов, лежащих в основе адаптации к стрессовым факторам среды, действующим на патоген во время инфекции организма-хозяина, играет важную роль в борьбе с *M. tuberculosis*.

M. smegmatis – непатогенный микроорганизм, обитающий в почве – в среде, характеризующейся широким спектром условий, лимитирующих рост, таких как гипоксия, низкий pH, ограниченное поступление питательных соединений [Rizvi et al., 2019]. Однако почва является средой менее агрессивной по сравнению с макрофагами организма, инфицируемого *M. tuberculosis*. В связи с этим *M. smegmatis* менее устойчив к окислительному стрессу, низкому pH, лимитированию источников азота и углерода, чем *M. tuberculosis* [Jiang et al., 2022]. Так, оценка минимальных ингибирующих концентраций (МИК) H_2O_2 , проведённая в более ранних работах, показала, что *M. smegmatis* более чувствителен к окислительному стрессу, вызванному воздействием H_2O_2 , чем *M. tuberculosis* [Li et al., 2014].

Важную роль в адаптации бактериальных клеток к стрессовым воздействиям различной природы могут играть системы ТА. Например, у *M. tuberculosis* за счёт активации многочисленных систем ТА может достигаться повышение выживаемости в условиях воздействия различных стрессовых факторов. Было показано, что системы ТА VarBC7, VarBC15, VarBC25 и VarBC26 играют важную роль в регуляции ответа на стресс, вызванный гипоксией, а системы ТА VarBC4 и VarBC22 – в ответе на окислительный стресс. Некоторые системы ТА *M. tuberculosis*, взаимодействуя друг с другом, обеспечивают формирование толерантности к стрессовым воздействиям. Примером являются системы ТА MazF3, MazF6 и MazF9 [Zhang et al., 2022]. В более ранних работах было показано, что делеция данных модулей приводит к снижению выживаемости *M. tuberculosis* в условиях воздействия окислительного стресса и стресса, связанного с лимитированием питательных соединений [Tiwari et al., 2015].

У *M. smegmatis* системы ТА также участвуют в ответе клеток на стрессовые факторы различной природы [Frampton et al., 2012]. Например, ранее было обнаружено, что системы ТА MSMEG_4447-4448 (MazEF), MSMEG_1277-1278 (Phd/Doc), MSMEG_1283-1284 (VarBC1) и MSMEG_0251-MSMEG_0252 участвуют в регуляции адаптации *M. smegmatis* к воздействию окислительного стресса [Zhang et al., 2022]. Также было показано, что модули *mazEF*, *phd/doc* и *varBC1* играют важную роль в адаптации к стрессу, вызванному воздействием высоких температур [Frampton et al., 2012].

1.1.4. Механизмы регуляции функционирования систем ТА

Несмотря на то, что системы ТА могут выполнять множество различных функций, тем самым, играя важную роль в физиологии бактериальной клетки, изучению механизмов их регуляции уделяется недостаточно внимания [Fraikin et al., 2020]. Предполагается, что регуляция функционирования модулей ТА осуществляется на нескольких уровнях: транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном [Fraikin et al., 2019].

1.1.4.1. Транскрипционный уровень регуляции

Как уже было сказано выше, для большинства модулей ТА II типа характерна каноническая организация, когда гену токсина предшествует ген, кодирующий антитоксин [Srivastava et al., 2021]. Однако были описаны несколько исключений - модулей с обратной организацией, у которых ген токсина расположен перед геном антитоксина (*mqsAR*, *hicAB*, *higAB* и *rnlAB*) [Fraikin et al., 2020]. В обоих случаях модули ТА представляют собой бицистронный оперон, с единого промотора которого транскрибируются гены токсина и антитоксина [Deter et al., 2017]. Однако у некоторых модулей с обратной организацией (*rnlAB* и *mqsAR*) обнаружены добавочные промоторы, с которых экспрессируются гены, кодирующие антитоксины (*rnlA* и

mqsA) [Fraikin et al., 2019]. Более сложный механизм регуляции транскрипции описан для модуля *hicAB*: с одного авторегулируемого промотора синтезируется транскрипт, усечённый в области рибосом-связывающего сайта (*hicA*), что способствует синтезу антитоксина HicB [Turnbull, Gerdes, 2017]. Транскрипция целого модуля осуществляется с дополнительного конститутивного промотора, локализованного перед модулем [Fraikin et al., 2020].

Для экспрессии систем ТА II типа характерна авторегуляция [Fraikin et al., 2019; Beck et al., 2020]. Как правило, белки антитоксины содержат ДНК-связывающий домен, который связывается с инвертированными повторами промотора модуля и подавляет его транскрипцию [Ramisetty, 2020]. У большинства описанных модулей с каноническим типом организации такое связывание является низкоаффинным [Fraikin et al., 2020]. Аффинность связывания может быть увеличена за счёт формирования комплекса антитоксина с соответствующим ему токсином [Демидёнок и др., 2014]. Кроме того, связывание с токсином способствует взаимодействию других антитоксинов с оператором модуля, что, в свою очередь, приводит к усилению репрессии транскрипции [Hayes F., Kedzierska B., 2014]. Однако при значительном увеличении соотношения токсин/антитоксин образуются насыщенные комплексы токсин-антитоксин, которые не могут связаться с регуляторными последовательностями и ингибировать транскрипцию [Fraikin et al., 2020]. В связи с тем, что связывание комплекса токсин-антитоксин с оператором осуществляется только при определённых условиях (соотношение антитоксин/токсин), данный механизм получил название «условного взаимодействия» [Deter H.S. et al, 2017]. За счёт такого метода регуляции предотвращаются случайные колебания транскрипционной активности. В связи с более эффективной трансляцией антитоксина по сравнению с токсином, активация экспрессии модуля ТА за счёт избытка токсина также будет способствовать синтезу антитоксина, тем самым поддерживая соотношение токсин/антитоксин на низком уровне [Deter H.S. et al, 2017]. В случае модулей ТА с обратной организацией антитоксины, напротив, утрачивают свою аффинность при связывании с токсином [Fraikin et al., 2020]. Например, в модулях *mqsAR*, *hicAB* токсин вытесняет антитоксин с последовательности оператора, а не является корепрессором, как в случае канонических модулей ТА [Turnbull, Gerdes, 2017].

Кроме авторегуляции экспрессии генов модулей ТА, существует регуляция транскрипции за счёт других белков [Fraikin et al., 2020]. Например, у *E. coli* белки IHF и Fis, участвующие в регуляции топологии нуклеоида, могут связываться с промоторами модулей ТА *hipBA* и *mazEF* и повышать их транскрипционную активность [Marianovsky et al., 2001].

1.2.4.2. Регуляция на уровне трансляции

Несмотря на то, что во всех системах ТА II типа транскрибируются оба гена: как кодирующий токсин, так и антитоксин, в различных исследованиях было показано, что эффективность трансляции антитоксина выше, чем токсина [Fraikin et al., 2020]. Например, трансляция антитоксина RelB осуществляется с эффективностью, превышающей трансляцию токсина RelA в 6 раз [Li et al., 2014]. Иной механизм регуляции описан у системы ТА ParDE: трансляция сопряжена с деградацией транскриптов токсина *parD* [Fraikin et al., 2020]. Таким образом, в нормальных условиях роста за счёт различных способов достигается молярный избыток антитоксина, что способствует нейтрализации токсина [Ramisetty et al., 2020].

1.1.4.1. Посттрансляционный уровень регуляции

В многочисленных исследованиях было показано, что антитоксины протеолитически нестабильны [Srivastava et al., 2021]. При стрессовых воздействиях происходит активация клеточных протеаз, которые осуществляют деградацию антитоксина [Kamruzzaman et al., 2020]. Различные антитоксины расщепляются разными протеазами [Sala et al., 2014]. Например, в деградации антитоксина CcdA принимает участие протеаза Lon, в то время как антитоксин Kis расщепляется протеазой ClpAP, а Phd – ClpXP [Fraikin et al., 2020].

1.1.5. Функционирование систем ТА как единой сети

Для систем ТА характерно наличие разного рода взаимодействий [Tu et al., 2020]. Кроме наиболее распространённых взаимодействий между токсином и антитоксином, относящимся к одному и тому же оперону, существуют взаимодействия между токсином и антитоксином из разных оперонов ТА. Данные модули ТА могут принадлежать либо одному и тому же, либо разным репликонам (хромосомные и плазмидные системы ТА) [Goeders, Melderer, 2014]. Подобные взаимодействия могут возникать как между гомологичными системами ТА (принадлежащими одному и тому же классу, например, RelBE или MazEF), [Yang et al., 2010], так и между негомологичными системами ТА, например, VapBC и MazEF [Zhu et al., 2010]. Наиболее подробно данные взаимодействия изучены у *M. tuberculosis* [Tandon et al., 2019]. Первая сеть включает в себя взаимодействия между гомологичными системами, например, RelBE [Goeders, Melderer, 2014]. Комплексы, состоящие из токсинов и антитоксинов из разных модулей *relBE*, способны связываться с промоторами соответствующих модулей и, предположительно, осуществлять перекрестную регуляцию их экспрессии [Tu et al., 2020]. Сравнительно недавно были обнаружены взаимодействия между модулями ТА *vapBC4* и *vapBC5* [Tandon et al., 2019; Jin et al., 2015], хотя ранее предполагалось, что токсины и антитоксины класса VapBC обладают высокой степенью специфичности по отношению друг к другу и, в связи с этим, взаимодействия между ними возникнуть не могут [Tu et al., 2020].

Вторая сеть включает в себя взаимодействия между негомологичными модулями ТА [Goeders, Melderer, 2014]. Такие взаимодействия были описаны у *M. tuberculosis* между токсином MazF6 и антитоксином VarB27, а также между токсином MazF9 и антитоксином VarB40 [Tandon et al., 2019]. Существование столь сложной и разветвлённой сети взаимодействий, вероятно, способствует более быстрой адаптации к стрессовым факторам, воздействующим на клетки патогена при инфицировании организма-хозяина [Goeders, Melderer, 2014].

Дополнительно могут возникать взаимодействия между системами ТА, относящимися к разным репликациям [Goeders, Melderer, 2014]. Некоторые антитоксины, кодируемые бактериальными хромосомами, способны связываться с плазмидными токсинами и нейтрализовывать их, тем самым, предотвращая гибель клеток. Например, хромосомный антитоксин RelB связывается с токсином RelE, локализованным на плазмиде p307 *E. coli*, и ингибирует его активность [Tu et al., 2020]. В связи с этим наблюдается феномен анти-аддикции (или гонка вооружений), т.е. давление отбора направлено в сторону хромосомных антитоксинов, способных нейтрализовывать плазмидные токсины. Вместе с тем, селективное преимущество получают те плазмидные токсины, с которыми не могут связаться хромосомные антитоксины [Goeders, Melderer, 2014]. Такой баланс необходим для поддержания плазмид в популяции бактериальных клеток, поскольку многие из таких плазмид дополнительно несут гены устойчивости к антибиотикам [Fraikin et al., 2020].

1.1.6. Вклад систем ТА в толерантность и устойчивость к антибиотикам у бактерий

Системы ТА II типа (в первую очередь, хромосомные модули) связаны с возникновением толерантности к антибиотикам у патогенных бактерий из-за участия в формировании персистенции [Kamruzzaman et al., 2020; Goossens et al., 2021]. Персистенция представляет собой эффективную эволюционную стратегию, позволяющую бактериальным клеткам переживать неблагоприятные воздействия окружающей среды [Vogwill T. et al., 2016]. Персистирующие клетки – субпопуляция бактериальных клеток, проявляющих толерантность к антибиотикам или к другим стрессовым факторам среды за счёт фенотипического перехода в дормантное состояние, в котором ключевые клеточные процессы, являющиеся мишенями, утрачивают свою активность [Berkvens et al., 2022]. Таким образом, персистирующие клетки способны выживать в присутствии антибиотиков (или другого стрессового фактора), хотя и утрачивают способность к делению в их присутствии [Boldrin et al., 2020]. Персистирующие клетки составляют малую часть от популяции бактериальных клеток (0,001-1%) [Dewatcher et al., 2019].

Взаимосвязь между возникновением персистирующих клеток и активностью систем ТА была установлена экспериментально. Впервые участие систем ТА в регуляции персистенции

было показано в работе Moyed и Bertrand (1983) на примере модуля ТА *hipAB E. coli*. С помощью метода химического мутагенеза была получена мутация в гене токсина *hipA7*, препятствующая образованию комплекса с антитоксином и, как следствие, приводящая к многократному (до 100-1000 раз) превышению уровня персистенции [Wood, 2016]. Позднее было обнаружено, что у персистирующих клеток значительно увеличивается уровень экспрессии ряда токсинов II типа, главным образом, рибонуклеаз, таких как, *relE*, *mazF*, *dinJ* и *mqsR* [Page, Peti, 2016]. Более того, показано, что сверхэкспрессия *hipA*, *relE* и *mazF* приводит к индукции персистенции, а экспрессия соответствующим им антитоксинов, напротив, ингибирует персистенцию [Michiels et al., 2016]. Также было обнаружено, что делеция модуля *pasTI E. coli* приводит к снижению выживаемости популяции бактериальных клеток при воздействии ампициллина и цiproфлоксацина [Ronneau, Helaine, 2019]. На основании полученных данных предполагается, что воздействие антибиотиков приводит к активации бактериальных протеаз (например, Lon), которые расщепляют антитоксин, что приводит к активации токсина [Wood, 2016]. В свою очередь, токсин расщепляет практически все клеточные мРНК, что приводит к прекращению делений и замедлению метаболизма бактериальной клетки [Paul et al., 2019]. При прекращении стрессового воздействия бактериальные клетки восстанавливают свою активность [Wood, 2016]. Наибольшая опасность персистирующих форм заключается в их способности индуцировать хронические рецидивирующие инфекции в организме-хозяине. В связи с этим исключительную важность в терапии бактериальных инфекций представляет борьба с dormantными формами [Paul et al., 2019].

1.2. Микобактериальные системы ТА

1.2.1. Системы ТА у микобактерий, их количество и распространённость в геномах различных представителей рода *Mycobacterium*

У различных видов микобактерий содержится разное число модулей ТА в геноме. Своего рода рекордсменом по количеству модулей ТА в геноме среди микобактерий является *M. tuberculosis*. В настоящее время в его геноме обнаружено 93 модуля ТА [Zhang et al., 2022]. Геномы других представителей рода *Mycobacterium* содержат меньшее количество генов систем ТА (Таблица 1.2.1.1.) [Sala et al., 2014].

Таблица 1.2.1.1. Число модулей ТА в геномах различных видов микобактерий

Микроорганизм	Число модулей ТА в геноме	Ссылка
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	93	[Zhang et al., 2022]
<i>Mycobacterium microtis</i>	66	[Kim et al., 2016]
<i>Mycobacterium africanum</i>	65	[Kim et al., 2016]
<i>Mycobacterium canetti</i>	60	[Kim et al., 2016]
<i>Mycobacterium gilvum</i>	14	[Sala et al., 2014]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	8	[Zhang et al., 2022]
<i>Mycobacterium avium</i>	3	[Sala et al., 2014]
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	2	[Sala et al., 2014]
<i>Mycobacterium marinum</i>	1	[Sala et al., 2014]

1.2.2. Системы ТА у *M. tuberculosis*

M. tuberculosis относится к видам, геном которых содержит значительное число модулей ТА. Из 93 предполагаемых систем ТА (Таблица 1.2.2.1.) [Agarwal et al., 2018; Zhang et al., 2022] 30 модулей ТА являются функционально активными [Lu et al., 2016]. Среди модулей ТА, представленных в геноме *M. tuberculosis*: системы ТА II типа, гибридная система II/IV типа - DarTG [Cai et al., 2020] и VII типа - MenTA3; [Yu et al., 2020]. При этом большинство модулей ТА *M. tuberculosis* относится ко II типу [Gupta et al., 2017], включая различные семейства: VapBC (51 модуль), MazEF (10 модулей), RemIK (1 модуль), RelBE (2 модуля), YefM/YoeB (1 модуль), HigBA (3 модуля) и ParDE (2 модуля) [Bordes et al., 2021].

Таблица 1.2.2.1. Функции систем ТА *M. tuberculosis*

Модуль ТА	Функция	Ссылки
VapBC1 (Rv0064a/Rv0065)	Деградация токсином одноцепочечных мРНК бактериальной клетки	[Lu et al., 2016]
VapBC2 (Rv0301-Rv0300)	Деградация токсином тРНК. Токсин обладает сильной РНКазной активностью, которая приводит к ингибированию роста	[Chauchan et al., 2022]

VapBC3 (Rv0550c-Rv0549c)	Регуляция процесса инфицирования организма-хозяина	[Agarwal et al., 2018]
VapBC4 (Rv0595c-Rv0596c)	Регуляция ответа на окислительный стресс. Токсин обладает слабой РНКазной активностью	[Barth et al., 2021]
VapBC5 (Rv0626-Rv0627)	Деградация токсином свободных РНК бактериальной клетки	[Miallau et al., 2009]
VapBC7 (Rv0661c-Rv0662c)	Регуляция ответа на стресс, вызванный гипоксией	[Sharrock et al., 2018]
VapBC11 (Rv1560-Rv1561)	Деградация токсином тРНК-Leu. Регуляция процесса инфицирования организма-хозяина	[Deep et al., 2018]
VapBC12 (Rv1720c-Rv1721c)	Участие в регуляции холестерина-индуцируемой персистенции	[Talwar et al., 2020]
VapBC15 (Rv2009-Rv2010)	Регуляция ответа на стресс, вызванный гипоксией	[Sharrock et al., 2018]
VapBC19 (Rv2547-Rv2548)	Токсин VapC19 – рибонуклеаза, осуществляющая слабое ингибирование роста.	[Sharrock et al., 2018]
VapBC20 (Rv2549c-Rv2550c)	Способствует выживанию <i>M. tuberculosis</i> в макрофагах и лёгких мышей и приматов	[Barth et al., 2021]
<i>Продолжение Таблицы 1.2.2.1.</i>		
VapBC21 (Rv2757c-Rv2758c)	Формирование толерантности к аминогликозидам и этамбутолу	[Sharma et al., 2020]
VapBC22 (Rv2829c-Rv2830c)	Адаптация к окислительному стрессу и регуляция иммунного ответа организма-хозяина	[Agarwal et al., 2020]
VapBC25	Регуляция ответа на стресс, вызванный гипоксией	[Sharrock et al., 2018]

(Rv0277A-Rv0277c)		
VapBC26 (Rv0581-Rv0582)	Регуляция ответа на стресс, вызванный гипоксией. Обеспечение длительной выживаемости <i>M. tuberculosis</i> в макрофагах и лёгких мышей и приматов. VapC26 – эффективный риботоксин, расщепляющий 23S рРНК в области сарцин-рициновой петли, что приводит к ингибированию бактериального роста	[Kang et al., 2017]
VapBC27 (Rv0598c-0599c)	Токсин VapC27 – рибонуклеаза, осуществляющая слабое ингибирование роста.	[Sharrock et al., 2018]
VapBC28 (Rv0608-Rv0609)	Токсин VapC28 деградирует тРНК-Ser клеток <i>M. tuberculosis</i>	[Walling, Butler, 2018]
VapBC29 (Rv0616A-Rv0617)	Токсин VapC28 деградирует тРНК-Trp клеток <i>M. tuberculosis</i> , приводя к выраженному ингибированию роста культуры	[Sharrock et al., 2018]
VapBC30 (Rv0623-Rv0624)	Токсин VapC30 деградирует тРНК-fMet клеток <i>M. tuberculosis</i> , приводя к ингибированию роста	[Lee et al., 2015]
VapBC31 (Rv0748-Rv0749)	Участие в регуляции персистенции	[Sharrock et al., 2018]
VapBC32 (Rv1113-Rv1114)	Токсин VapC32 деградирует тРНК-Leu клеток <i>M. tuberculosis</i> , приводя к ингибированию роста	[Winther et al., 2016]
<i>Продолжение Таблицы 1.2.2.1.</i>		
VapBC33 (Rv1241-Rv1242)	Токсин VapC33 деградирует тРНК-Trp клеток <i>M. tuberculosis</i> , приводя к ингибированию роста	[Winther et al., 2016]
VapBC39 (Rv2530c-Rv2530A)	Токсин VapC39 деградирует тРНК-Trp, приводя к ингибированию роста культуры	[Sharrock et al., 2018]

VapBC43 (Rv2871-Rv2872)	Повышение выживаемости в условиях воздействия ванкомицина	[Eun et al., 2022]
VapBC45 (Rv3180c-Rv3181c)	Повышение выживаемости <i>M. tuberculosis</i> в макрофагах и лёгких приматов и мышей	[Slayden et al., 2018]
VapBC46 (Rv3384c-Rv3385c)	Обеспечение адаптации к стрессовым воздействиям различной природы, формирование вирулентности	[Zaychikova et al., 2015; Zakharevich et al., 2019]
VapBC51 (Rv0229c-Rv0239c)	Токсин VapC51 (Rv0229c) является Mg ²⁺ -зависимой рибонуклеазой, предположительно, деградирующей тРНК	[Kang, 2023]
MazEF6 (Rv1991A-Rv1991c)	Регуляция перехода в состояние персистенции	[Slayden et al., 2018]
ParDE1 (Rv1959c-Rv1960c)	Токсин ParE1 играет важную роль в выживании <i>M. tuberculosis</i> в активных макрофагах организма-хозяина, а также в распространении инфекции в лёгких мышей	[Slayden et al., 2018]
HigAB1 (Rv1955-Rv1956)	Антитоксин HigA1 является одним из ключевых регуляторов транскрипции генов, играющих важную роль в выживании внутри макрофагов	[Slayden et al., 2018]
RelBE1	Регуляция адаптации в условиях воздействия иммунной системы организма-хозяина	[Slayden et al., 2018]
RelBE2		

Подавляющее большинство модулей ТА кодируется мобильными участками генома, что указывает на возможность их приобретения путём горизонтального переноса [Ramage et al., 2009]. Значительное число модулей ТА в геноме *M. tuberculosis* может быть связано с многочисленными событиями дупликации генов. Однако данный процесс дупликации, по-видимому, был неконгруэнтным, т.к. эволюция антитоксинов была связана с подавлением активности токсинов, участвующих в регуляции бактериального роста. Соответственно, существует несколько эволюционных сценариев, возможных после дупликации: 1 – гены, кодирующие токсин и антитоксин, приобрели мутации, которые привели к утрате активности

кодируемых ими белков. После дубликации эволюция этих генов продолжалась, и в определённый временной промежуток белки токсина и антитоксина восстановили свои функции, но приобрели активность, отличную от предковых белков; 2 – гены систем ТА сохраняют свою функциональность в ином регуляторном контексте; 3 – эволюция модулей ТА связана с более беспорядочными взаимодействиями кодируемых ими белков, что, в конечном счёте, способствует сосуществованию многочисленных функциональных систем ТА [Slayden et al., 2018].

Между системами ТА *M. tuberculosis* существуют различные взаимодействия. Они могут осуществляться между токсином и антитоксином, принадлежащими одному семейству. Так, предполагается наличие взаимодействий между модулями *varBC11* и *varBC15*, *varBC4* и *varBC5*, *mazEF6* и *mazEF9* [Tandon et al., 2020]. Кроме того, были обнаружены взаимодействия между компонентами систем ТА, относящихся к разным семействам [Goeders et al., 2014]. Например, взаимодействия между антитоксином VarB40 и токсином MazF6, антитоксином VarB27 и токсином MazF6, антитоксином VarB40 и токсином MazF9, антитоксином VarB27 и токсином MazF6 [Tandon et al., 2020].

Наличие столь значительного количества модулей ТА в геноме в совокупности со сложной сетью разного рода взаимодействий между ними имеет ключевое значение при адаптации *M. tuberculosis* к стрессовым воздействиям различной природы, формировании вирулентности, а также при переходе в метаболически неактивное состояние и формировании толерантности к антимикробным соединениям [Slayden et al., 2018].

1.2.2.1. Система ТА VarBC46 как один из ключевых регуляторов ответа *M. tuberculosis* на стрессовые воздействия

Система ТА VarBC46, предположительно, играет ключевую роль в адаптации *M. tuberculosis* к стрессовым воздействиям [Gupta et al., 2017], а также участвует в формировании вирулентности [Mikheeva et al., 2017]. Показано, что экспрессия генов модуля *varBC46* активируется в ответ на клеточный стресс [Gupta et al., 2017]. Антитоксин VarB46 (Rv3385c) связывается с соответствующим ему токсином – VarC46 (Rv3384c) и ингибирует его активность. В растворе белок антитоксина формирует тетрамер, при этом молекулярная масса мономерной единицы составляет 19 кДа [Roy et al., 2019]. Как и большинство антитоксинов II типа, VarB46 состоит из двух доменов: N-концевого (ДНК-связывающего) домена и C-концевого (токсин-связывающего) домена [Roy et al., 2019]. C-концевой неструктурированный участок VarB46 связывается с отрицательно заряженным карманом токсина VarC46, препятствуя его доступу к субстрату РНК [Roy et al., 2020]. Также предполагается, что C-концевой участок, помимо

связывания с токсином VarC46, может участвовать в тетрамеризации антитоксина VarB46 [Roy et al., 2019]. Показано, что N-концевой домен VarB46 связывается с участком промотора длиной 148 п.н. в двух сайтах, при этом данное связывание специфично [Roy et al., 2019]. За счёт связывания антитоксина с регуляторной последовательностью обеспечивается авторегуляция экспрессии всего модуля. Токсин VarC46 является Mg-зависимой рибонуклеазой, способной ингибировать трансляцию посредством деградации клеточных РНК [Roy et al., 2020]. Для функционирования VarC46 необходимо наличие ионов Mg^{2+} , т.к. в присутствии ЭДТА, связывающей Mg^{2+} , РНКазная активность VarC46 утрачивается [Roy et al., 2020]. В работе Roy (2020) было показано, что сверхэкспрессия гена токсина *varC46* ингибирует бактериальный рост, причём данный бактериостатический эффект не является специфичным для микобактерий, а распространяется и на другие бактериальные виды, например, *E. coli* [Roy et al., 2020].

Анализ трёхмерной структуры белка токсина VarC46 показал наличие структурного сходства с другим токсином *M. tuberculosis* – VarC30 [Roy et al., 2020]. Кроме того, было обнаружено, что аминокислотные остатки Asp7 (D7), Glu43 (E43), Asp91 (D91) и Asp112 (E112), вероятно, формируют координационные связи с Mg^{2+} за счёт образования отрицательно заряженного кармана (Рисунок 1.2.2.1.1.) [Roy et al., 2020]. Это позволяет предположить участие данных аминокислотных остатков в формировании активного сайта белка токсина. В связи с этим особый интерес представляет изучение влияния мутаций, затрагивающих активный центр белка VarC46, на его функцию.

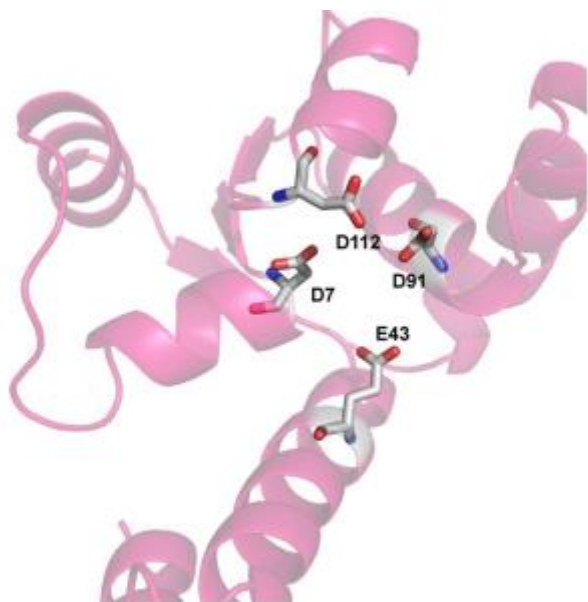


Рисунок 1.2.2.1.1. Трёхмерная модель белка токсина VarC46. На рисунке обозначены аминокислотные остатки, образующие активный сайт белка: D7 – аспарагиновая кислота7, E43 – глутаминовая кислота43, D91 – аспарагиновая кислота91, D112 - аспарагиновая кислота112 [Адаптировано из Roy et al., 2020].

1.2.2.2. Мутация в гене *varC46* S₁₁₃G характерна для высоковирулентной сублинии Beijing-B0/W148

В последние годы значительное внимание уделяется изучению генетического разнообразия и географической распространённости *M. tuberculosis* [Fresci et al., 2021]. Точная идентификация линий и сублиний *M. tuberculosis* приобретает особенное значение при оценке вирулентности, лекарственной устойчивости, а также при разработке вакцин, т.к. данные характеристики могут варьировать в зависимости от линии *M. tuberculosis* [Coll et al., 2014].

В настоящее время определены девять линий *M. tuberculosis* [Fresci et al., 2021]. Данная классификация базируется на результатах сполиготипирования (метод типирования основанный на анализе полиморфизма прямых повторов локуса CRISPR) [Brudey et al., 2006], исследования крупных делеций и однонуклеотидных полиморфизмов в геноме *M. tuberculosis* [Coll et al., 2014; Fresci et al., 2021], а также на данных о географической распространённости *M. tuberculosis* [Gagneux et al., 2006]. Внутри данных линий выделяют 55 сублиний: 8 для L1, 6 для L2, 5 для L3 и 36 для L4 [Coll et al., 2014]. Для каждой из сублиний определён характерный набор однонуклеотидных замен, так называемый SNS-штрихкод (от single nucleotide substitution) [Fresci et al., 2021].

В России наибольшее распространение получили три сублинии *M. tuberculosis*: Ural (L4), LAM (L4) и Beijing (L2) [Bespyatykh et al., 2016]. Среди описанных штаммов *M. tuberculosis* с множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) значительная часть относится к сублинии Beijing [Bespyatykh et al., 2019]. Beijing – наиболее полно охарактеризованный ключевой представитель Восточно-Азиатской линии *M. tuberculosis* [Mokrousov et al., 2022]. Данная сублиния делится на филогенетические кластеры: древний или предковый и современный [Mokrousov et al., 2022]. Штаммы *M. tuberculosis*, относящиеся к древнему кластеру Beijing, характеризуются низкой распространённостью на территории Российской Федерации [Mokrousov et al., 2022]. Современный кластер Beijing включает в себя два основных эндемичных генотипа: Центрально-Азиатский и Beijing-B0/W148 [Shitikov et al., 2017]. Главным отличием между этими генотипами является их взаимосвязь с лекарственной устойчивостью [Mokrousov et al., 2022]. Возникновение множественной лекарственной устойчивости чаще всего было описано в штаммах генотипа Beijing-B0/W148, что свидетельствует о большей опасности данного генотипа [Mokrousov et al., 2022].

В связи с этим особый интерес для изучения представляет кластер Beijing-B0/W148 [Bespyatykh et al., 2019]. Одной из главных отличительных особенностей данного кластера

является наличие обширных хромосомных перестроек, что, в целом, нетипично для *M. tuberculosis*, для которого рекомбинация является крайне редким событием [Bespyatykh et al., 2019]. Кроме того, в изолятах Beijing-B0/W148 была обнаружена мутация сдвига рамки считывания в гене *kdpD*, кодирующем сенсорный белок гистидин киназу, что привело к повышению вирулентности [Parish T., 2003]. Помимо повышенной вирулентности изоляты *M. tuberculosis*, относящиеся к кластеру Beijing-B0/W148, проявляют высокую трансмиссивность и устойчивость к антибиотикам [Bespyatykh et al., 2019]. Позднее были описаны мутации в других генах *M. tuberculosis* Beijing-B0/W148, ассоциированные с повышением вирулентности [Mikhecheva et al., 2017]. В частности, были описаны мутации в трёх генах: A₁₂₂₉C *mce3F* (кодирует белок клеточной стенки, играющий важную роль в выживании *M. tuberculosis* внутри макрофагов), G₅₂₃A *irtB* (кодирует транспортёр, осуществляющий перенос ионов железа внутрь бактериальной клетки) и C₁₁₃G *vapC46* (кодирует токсин) [Shur et al., 2016]. Комплекс из данных мутаций характерен для кластера Beijing-B0/N-90, выделяемого внутри сублинии Beijing-B0/W148 [Mikhecheva et al., 2017]. Мутация в гене токсина C₁₁₃G *vapC46* приводит к аминокислотной замене аланина на глицин в 38 позиции (A38G), что может привести к изменению функции токсина VapC46 [Mikhecheva et al., 2017].

1.2.3. Системы ТА у *M. smegmatis*

M. smegmatis представляет собой удобную модель для изучения систем ТА, благодаря отсутствию патогенности, простоте культивирования и короткому времени генерации [Frampton et al., 2011, Sparks et al., 2023]. В отличие от *M. tuberculosis*, геном *M. smegmatis* содержит значительно меньшее количество систем ТА [Eroshenko et al., 2020]. В настоящее время описано 8 предполагаемых систем ТА (Рисунок 1.2.3.1.) [Zhang et al., 2022]. Все системы ТА *M. smegmatis* относятся ко II типу. Гомологи некоторых из них обнаружены в геноме *M. tuberculosis*. Например, MSMEG_1283-1284 - гомологична системе VapBC30 *M. tuberculosis* (степень сходства нуклеотидной последовательности 76%) [blast.ncbi.nlm.nih.gov]. MSMEG_6760-6762 гомологична Rv2034-2035, MSMEG_0251-0252 – является гомологом Rv0207c-0208c [Zhang et al., 2022]. В работе Zhang (2022) было показано, что делеция 8 предполагаемых систем ТА приводит к выраженному снижению выживаемости в условиях заражения бактериофагом, а также воздействия стрептомицина и изониазида. Также было обнаружено, что системы ТА MSMEG_4448-4447 и MSMEG_5634-5635 играют важную роль в выживании *M. smegmatis* в условиях недостатка питательных соединений и заражения бактериофагом [Zhang et al., 2022]. Кроме того, система ТА MSMEG_1277-1278, предположительно, участвует в регуляции устойчивости к изониазиду, а MSMEG_0251-0252 – может играть важную роль в адаптации к окислительному стрессу, вызванному H₂O₂ [Zhang et al., 2022]. Вместе с тем данные относительно

роли системы TA VarBC2 (MSMEG_6760-6762) в адаптации к стрессовым воздействиям среды на сегодняшний день отсутствуют.

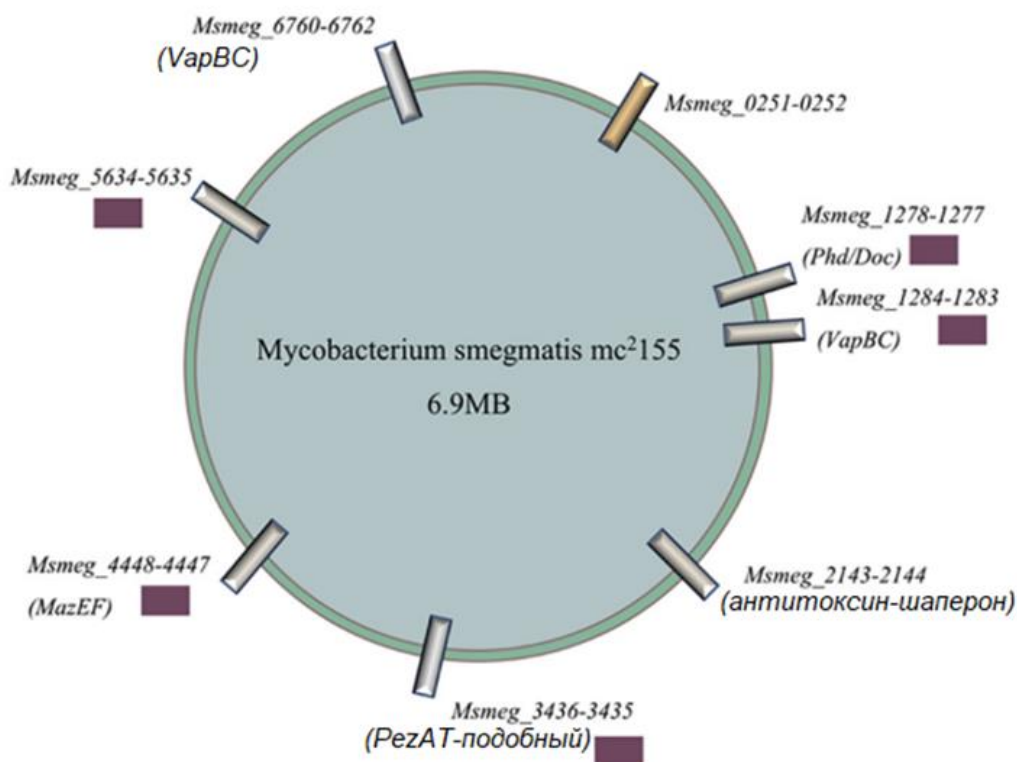


Рисунок 1.2.3.1. Системы ТА *M. smegmatis* Фиолетовыми прямоугольниками обозначены системы ТА, функциональная активность которых показана экспериментально [Адаптировано из Zhang et al., 2022].

1.2.4. Система ТА VarBC2 *M. smegmatis*, её роль в регуляции роста и ответа бактериальных клеток на стрессовые воздействия

В 2016 году была описана четвертая система ТА у *M. smegmatis* – VarBC2 (MSMEG_6760-6762) [Bajaj R.A. et al., 2016]. Это система ТА II типа у *M. smegmatis*, относящаяся к семейству VarBC [Frampton et al., 2012].

VarB2 – антитоксин, состоящий из 115 аминокислотных остатков. Предполагается, что он имеет петля-поворот-петля ДНК-связывающий домен, который играет важную роль во взаимодействии с ДНК [Bajaj R.A. et al., 2016]. Антитоксин VarB2 относится к классу репрессоров ArsR-типа, которые являются ключевыми регуляторами клеточного ответа на стресс, вызванный воздействием тяжёлых металлов [Hayes, Kedzierska, 2014]. VarB2, как и другие транскрипционные регуляторы ArsR-типа, способен связываться с собственным промотором и подавлять экспрессию [Bajaj R.A. et al., 2016]. Антитоксин VarB2 образует стабильный комплекс с токсином VarC2 [Bajaj R.A. et al., 2016].

Также в работе Duan (2022) было показано, что антитоксин VarB2, как транскрипционный регулятор, участвует в активации экспрессии гена *MSMEG_1275*, кодирующего ДНКазу семейства HNH [Duan et al., 2022]. Сверхэкспрессия гена *varB2* приводит к повышению уровня экспрессии порядка 580 генов *M. smegmatis*, среди которых ген *MSMEG_1275* [Duan et al., 2022]. ДНКазы *MSMEG_1275* вносит двунитевые повреждения хромосомной ДНК, что, в конечном счёте приводит к остановке делений и к гибели клеток [Duan et al., 2022].

Токсин VarC2 состоит из 161 аминокислотного остатка. Как и большинство токсинов II типа, VarC2 является рибонуклеазой [Bajaj R.A. et al., 2016]. Однако Bajaj (2016) в ходе проведения рентгеноструктурного и биоинформатического анализа было показано наличие на внешней поверхности токсина VarC2 множественных участков с отрицательным потенциалом. При этом лишь сравнительно небольшая область заряжена положительно. Величина положительного заряда недостаточна для связывания с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами [Bajaj R.A. et al., 2016]. В связи с этим можно предположить, что VarC2, в отличие от большинства микобактериальных токсинов II типа, может обладать слабой рибонуклеазной активностью.

Структура VarC2 представлена изогнутым β -слоем, состоящим из восьми антипараллельных β -цепей с двумя длинными закрученными α -спиралями, располагающимися напротив вогнутой поверхности β -слоя (Рисунок 1.2.4.1.) [Bajaj R.A. et al., 2016]. Одна из α -спиралей локализована между второй и третьей β -цепями, другая – в С-концевой части структуры. Такое расположение спиралей относительно β -слоя обеспечивает формирование обширной гидрофобной полости (кармана), окружённой множеством гидрофобных аминокислотных остатков, которая, по-видимому, способствует связыванию гидрофобных лигандов [Bajaj R.A. et al., 2016]. В качестве субстрата могут быть использованы разнообразные гидрофобные лиганды, такие как липиды, гормоны, полициклические ароматические углеводороды и РНК [Bajaj R.A. et al., 2016]. Предполагается, что функционирование лиганд-связывающего кармана осуществляется по механизму «замок с защёлкой», который был впервые описан на примере рецептора к абсцизовой кислоте у растений [Melcher K. et al., 2010]. Вхождению в лиганд-связывающий канал препятствует, с одной стороны, ворото-подобная петля, а с другой – затвор-подобный участок [Bajaj R.A. et al., 2016]. Анализ трёхмерной структуры токсина VarC2 позволяет предположить наличие сходного механизма регуляции активности [Bajaj R.A. et al., 2016].

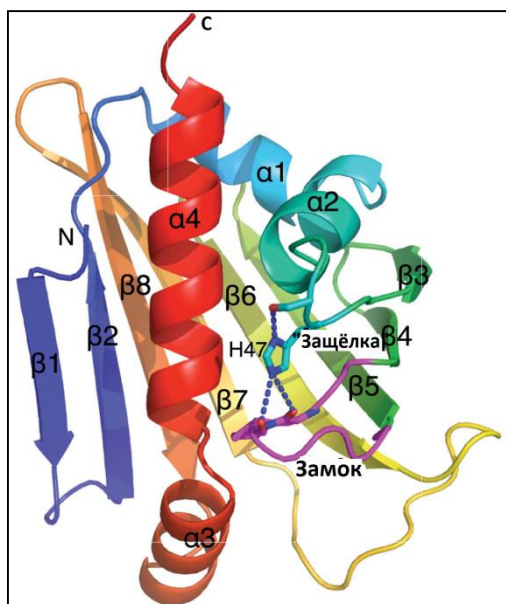


Рисунок 1.2.4.1. Структура белка токсина VarC2 *M. smegmatis* [Bajaj R. A. et al., 2016].

В геноме *M. tuberculosis* был обнаружен модуль, гомологичный *varBC2* у *M. smegmatis* – *rv2034-2035* [Bajaj R.A. et al., 2016]. Ген *rv2034* кодирует антитоксин, *rv2035* – токсин [Bajaj R.A. et al., 2016]. Показано, что антитоксин Rv2034, так же, как и VarB2, осуществляет регуляцию экспрессии всего модуля *rv2034-2035* [Keren et al., 2011].

1.3. Участие систем ТА в регуляции фолдинга белков и функционирования оперона *dosR*

1.3.1. Участие систем ТА в регуляции фолдинга белков

Молекулярные шапероны представляют собой белки, осуществляющие восстановление третичной и четвертичной структуры клеточных белков, при которой они сохраняют свою функциональную активность [Kudryavtseva et al., 2021]. Главными шаперонными комплексами у бактерий являются: триггер-фактор, DnaK-ClpB-DnaJ-GrpE и GroEL-GroES [Sabate et al., 2010]. У микобактерий ключевую роль в фолдинге белков играет система шаперонов DnaK-ClpB [Fay, Glickmann, 2014]. DnaK (или Hsp70) участвует в сворачивании белков, как синтезированных *de novo*, так и неправильно свёрнутых белков [Rosenzweig et al., 2017]. DnaK функционирует в комплексе с кошаперонами (DnaJ1 и DnaJ2), а также с нуклеотид-обменивающим фактором (GrpE) [Kataridis et al., 2021]. Кошапероны DnaJ обеспечивают связывание DnaK с различными субстратами и стимулируют его АТФазную активность [Fay et al., 2021]. Связывание белка GrpE приводит к диссоциации нуклеотида (АДФ) с DnaK [Yin et al., 2021]. Таким образом, сбрасывается цикл конформационных изменений DnaK, что способствует диссоциации субстрата при повторном связывании АТФ [Kataridis et al., 2021]. В комплексе с DnaK функционирует шаперон ClpB, синергично повышая эффективность фолдинга белков с затратой энергии АТФ [Harnagel et al., 2021].

Шаперонные белки играют важную роль в ответе на стрессовые воздействия [Fay et al., 2014]. Воздействие стрессовых факторов на клетку, как правило, приводит к агрегации клеточных белков [Fay et al., 2021]. Существуют 2 класса белковых агрегатов: амилоидные и аморфные (или тельца включения) [Wang et al., 2008]. Амилоидные агрегаты характеризуются высокой степенью упорядоченности, в то время как у аморфных агрегатов она отсутствует [Bollen et al., 2021]. Хотя агрегация белков, как правило, ассоциируется с утратой ими функций, она также может способствовать выживанию бактериальных клеток в условиях стресса [Schramm et al., 2020]. Более того, агрегация белков может увеличивать выживаемость бактерий не только в условиях теплового шока или окислительного стресса, но и при воздействии антибиотиков за счёт индукции перехода в дормантное состояние, что приводит к антибиотикотолерантности [Bollen et al., 2021]. Предполагается, что агрегация белков приводит к индукции дормантного состояния за счёт ингибирования некоторых важнейших клеточных метаболических путей [Schramm et al., 2020]. Существует корреляция между количеством белковых агрегатов и глубиной дормантного состояния, что свидетельствует о возможности существования пути перехода клеток из чувствительного состояния в дормантное (Рисунок 1.3.1.1.) [Pu et al., 2019].

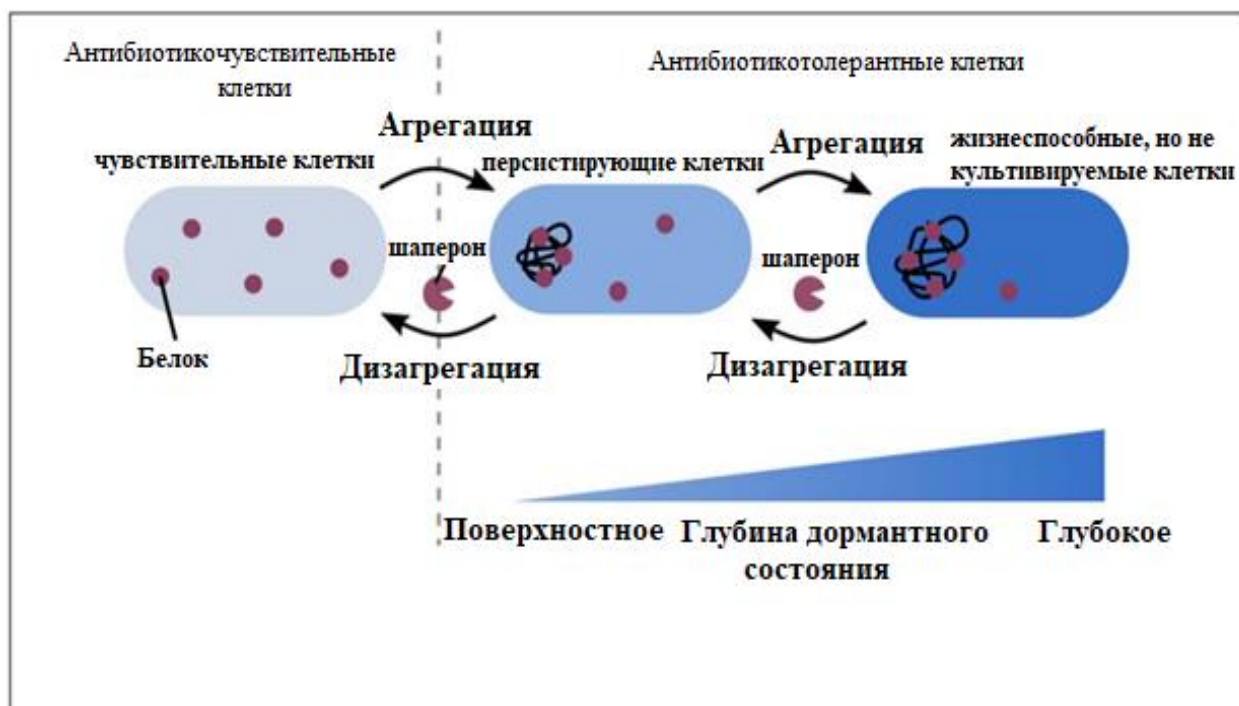


Рисунок 1.3.1.1. Модель, иллюстрирующая роль агрегации белков в переходе в дормантное состояние и активации бактериальных клеток. Агрегация белков, предположительно, индуцирует переход от чувствительности к дормантному персистирующему состоянию. Дальнейшая агрегация белков приводит к переходу от персистирующего к более глубокому дормантному состоянию - жизнеспособным, но не культивируемым бактериальным клеткам. За счёт перехода в дормантное состояние бактерии приобретают антибиотикотолерантность. Возникновение толерантности к антибиотикам обусловлено, главным образом, снижением числа белков, составляющих различные метаболические пути бактериальной клетки. Для перехода в метаболически активное состояние, в первую очередь, необходимо удаление белковых агрегатов, в котором важную роль играют шапероны [Bollen et al., 2021].

Описано 2 дормантных фенотипа: персистирующие клетки – в условиях стресса переходящие в метаболически неактивное состояние и восстанавливающие рост при прекращении воздействия стрессового фактора; и жизнеспособные, но не культивируемые бактерии - остающиеся метаболически активными в условиях стресса, но утратившие способность расти на стандартной среде без добавления специфического фактора при нормальных условиях роста [Bollen et al., 2021]. Жизнеспособные, но не культивируемые бактерии представляют собой более глубокую стадию перехода в дормантное состояние [Schramm et al., 2020]. При прекращении воздействия стрессового фактора среды дормантные клетки восстанавливают способность к клеточным делениям и метаболическую активность [Bollen et al., 2021]. Это осуществляется за счёт уменьшения белковых агрегатов в клетках. Важную роль в процессе дизагрегации играют шапероны, которые осуществляют правильное сворачивание белков, что необходимо для их функционирования [Pu et al., 2019]. Не все агрегированные белки подлежат дизагрегации: повреждённые или ненужные клетке белки деградируются клеточными протеазами [Schramm et al., 2020].

Клеточные шапероны, кроме фолдинга белков и регуляции ответа на стресс, непосредственно участвуют в поддержании мутаций устойчивости к антибиотикам за счёт стабилизации аминокислотных замен в генах-мишенях антибиотиков, тем самым, смягчая стрессовое воздействие, вызванное данными заменами [Fay et al., 2021].

В некоторых работах показано участие компонентов систем ТА в регуляции активности шаперонов. Например, было обнаружено, что сверхэкспрессия гена токсина *mazF6 M. tuberculosis* приводит к повышению уровня экспрессии гена *rv0251c*, кодирующего белок Hsp20, а также *dnaK*, что может являться подтверждением перехода бактериальных клеток в метаболически неактивное состояние при активации токсина MazF6 [Chattopadhyay et al., 2022].

Ещё одной системой ТА, предположительно, участвующей в регуляции активности шаперонов, является VarBC2 *M. smegmatis*. При поиске гомологов VarC2 (MSMEG_6760) с помощью PSI-BLAST был обнаружен эукариотический белок, относящийся к семейству активаторов Hsp90, гомологов АТФаза-подобных белков 1-ого типа [Bajaj R. A. et al., 2016]. Эукариотические гомологи играют важную роль в обеспечении эффективности сворачивания белков в условиях стресса [Bajaj R. A. et al., 2016]. Следует отметить, что в микобактериальных клетках отсутствует белок – гомолог Hsp90, однако был обнаружен белок Hsp70/DnaK – главный шаперонный белок микобактерий, препятствующий агрегации белков в условиях стресса [Bajaj R. A. et al., 2016]. DnaK, предположительно, играет ключевую роль в ответе клетки на воздействие высоких температур за счёт связывания с репрессором и активации экспрессии генов теплового шока. Анализ делеционных мутантов *M. smegmatis* показал, что нарушение функции DnaK приводит к формированию массивных белковых агрегатов, остановке клеточного роста и образованию бактериальных филаментов [Fay, Glickman, 2014]. Предполагается, что токсин VarC2 участвует в активации DnaK в ответ на стрессовые воздействия среды [Bajaj R.A. et al., 2016].

Кроме регуляции активности шаперонов за счёт функционирования систем ТА, существуют трёхкомпонентные системы ТА, включающие, помимо токсина и антитоксина, гены, кодирующие шаперонные белки [Mansour et al., 2022]. Белки-шапероны, как правило, участвуют в фолдинге антитоксина и препятствуют его деградации, тем самым, способствуя ингибированию токсина [Guillet et al., 2019]. Наиболее подробно изучена система токсин-антитоксин-шаперон у *M. tuberculosis* - Rv1955-Rv1956-Rv1957 [Sala et al., 2014]. Ген *rv1955* кодирует токсин HigB1, *rv1956* – антитоксин HigA1, *rv1957* – SecB-подобный шаперон [Bordes et al., 2016]. Предполагается, что токсин HigB1 обладает высокой степенью активности, т.к. делеция соответствующего ему антитоксина HigA летальна для *M. tuberculosis* [Mansour et al., 2022]. Показано, что HigB1 – рибосом-зависимая рибонуклеаза, расщепляющая мРНК шаперонов *cspA*

[Texier et al., 2021] и *groES* [Mansour et al., 2022]. Белок Rv1957 гомологичен шаперону SecB *E. coli*, он специфично взаимодействует с С-концевым участком белка антитоксина и препятствует его агрегации и деградации [Guillet et al., 2019]. Экспрессия модуля Rv1955-Rv1956-Rv1957 индуцируется в ответ на фагоцитоз макрофагами организма-хозяина и на другие значимые стрессовые воздействия, такие как повреждение ДНК, тепловой шок, голод, гипоксия и персистенция в условиях воздействия антибиотиков [Tetier et al., 2021].

1.3.2. Участие систем ТА в регуляции оперона *dosR*

Оперон *dosR* представляет собой регуляторную систему, в состав которой входят гены, кодирующие белки DosS (DevS) - выполняет функцию гем-содержащего сенсора, участвующего в фосфорилировании DosR; и DosR – ДНК-связывающего белка, участвующего в регуляции перехода микобактерий в dormantное состояние [Domenech et al., 2016]. Также у *M. tuberculosis* обнаружен второй сенсор – DosT, участвующий в контроле ответа на переход бактериальных клеток в dormantное состояние, реализуемый DosR [Sivaramakrishnan, Montellano, 2013]. Связывание фосфорилированного белка DosR с ДНК приводит к активации экспрессии 48 генов, составляющих регулон DosR [Domenech et al., 2016]. Белки, кодируемые данными генами, участвуют в анаэробном дыхании, метаболизме (нуклеотидов, углерода и липидов), в ответе бактериальных клеток на изменение окислительно-восстановительного баланса при воздействии оксида азота (NO) и гипоксии [Hudock et al., 2017]. В многочисленных работах было показано, что к активации оперона *dosR* приводит воздействие антибиотиков и иммунный ответ организма-хозяина, что, в свою очередь, является одной из причин возникновения толерантности у *M. tuberculosis* [Sivaramakrishnan, Montellano, 2013].

Компоненты оперона *dosR* находятся в тесном взаимодействии с другими регуляторными системами *M. tuberculosis* [Hudock et al., 2017]. Например, описаны взаимодействия между DosR, WhiB3 и PhoPR [Domenech et al., 2016]. Таким образом, существует регуляторная сеть, связывающая ответ на стресс, обусловленный гипоксией с регуляцией окислительно-восстановительного баланса (DosR-WhiB3) и с биосинтезом липидов (WhiB3-PhoP) [Domenech et al., 2016].

Кроме того, функционирование оперона *dosR* связано с системами ТА. Так, было обнаружено, что антитоксин Rv2034 *M. tuberculosis* участвует в активации оперона *dosR*, играющего важную роль в адаптации к недостатку кислорода при инфицировании макрофагов [Gao et al., 2012].

1.4. Прикладное применение систем ТА

1.4.1. Применение систем ТА в генетической инженерии

Наряду с многообразием выполняемых функций, системы ТА имеют большое практическое значение [Kamruzzaman et al., 2021]. Во-первых, знания о механизме функционирования модулей ТА находят применение в биотехнологии при конструировании экспрессионных векторов, а также при отборе трансформантов, несущих интересующую исследователя генетическую конструкцию, как среди прокариотических, так и среди эукариотических клеток в культуре [Chan et al., 2016].

Одним из практических приложений является конструирование векторов на основе систем ТА [Kamruzzaman et al., 2020]. Зачастую при проведении клонирования исследователи сталкиваются с низкой частотой вставки интересующего фрагмента, получая, в большинстве случаев, трансформантов, несущих вектор без вставки [Unterholzner et al., 2013]. Существенным недостатком многих экспрессионных векторов является невозможность применения простых методов позитивной селекции трансформантов, содержащих интересующую вставку (возможна лишь позитивная селекция трансформантов, несущих экспрессионный вектор) [Chan et al., 2016].

С целью решения данной проблемы была разработана векторная система, позволяющая существенно упростить отбор трансформантов, несущих искомую вставку [Unterholzner et al., 2013]. Она основана на системе ТА [Kamruzzaman et al., 2020]. Такой вектор содержит ген токсина из F-плазмиды под сильным промотором [Unterholzner et al., 2013]. Вставка фрагмента ДНК инактивирует ген токсина, тем самым позволяя вырасти только трансформантам, несущим интересующую вставку (Рисунок 1.4.1.1. А) [Stieber et al., 2008].

Ещё одна система для клонирования – Gateway cloning – основана на механизме рекомбинации бактериофага λ [Unterholzner et al., 2013]. Векторная плаزمида содержит ген токсина *ccdB*, локализованный между сайтами прикрепления *attP1* и *attP2* [Srivastava et al., 2021]. К клонируемому фрагменту с помощью праймеров, для прохождения рекомбинации добавляются сайты прикрепления *attB1* и *attB2*, комплементарные *attP* [Stieber et al., 2008] (Рисунок 1.4.1.1. Б). Клетки, несущие пустую векторную плазмиду, погибнут, вследствие экспрессии и накопления активного токсина [Unterholzner et al., 2013]. Образовывать колонии будут лишь те бактериальные клетки, в которых произошла рекомбинация с заменой гена токсина на интересующий исследователя ген [Srivastava et al., 2021].

Модуль *ccdAB* также используется в системе StabyCloning, в которой векторная плазмиды содержит усечённый вариант гена антитоксина *ccdA* [Srivastava et al., 2021]. При клонировании гена интереса к его 5'-концу с помощью праймеров присоединяется последовательность длиной

14 п.н., которая восстанавливает активность антитоксина, нейтрализующего токсин [Unterholzner et al., 2013] (Рисунок 1.4.1.1. В). Это способствует сохранению жизнеспособности клетки [Stieber et al., 2008]. Таким образом, колонии будут образованы только трансформантами, несущими вставку необходимого гена в правильной ориентации [Srivastava et al., 2021].

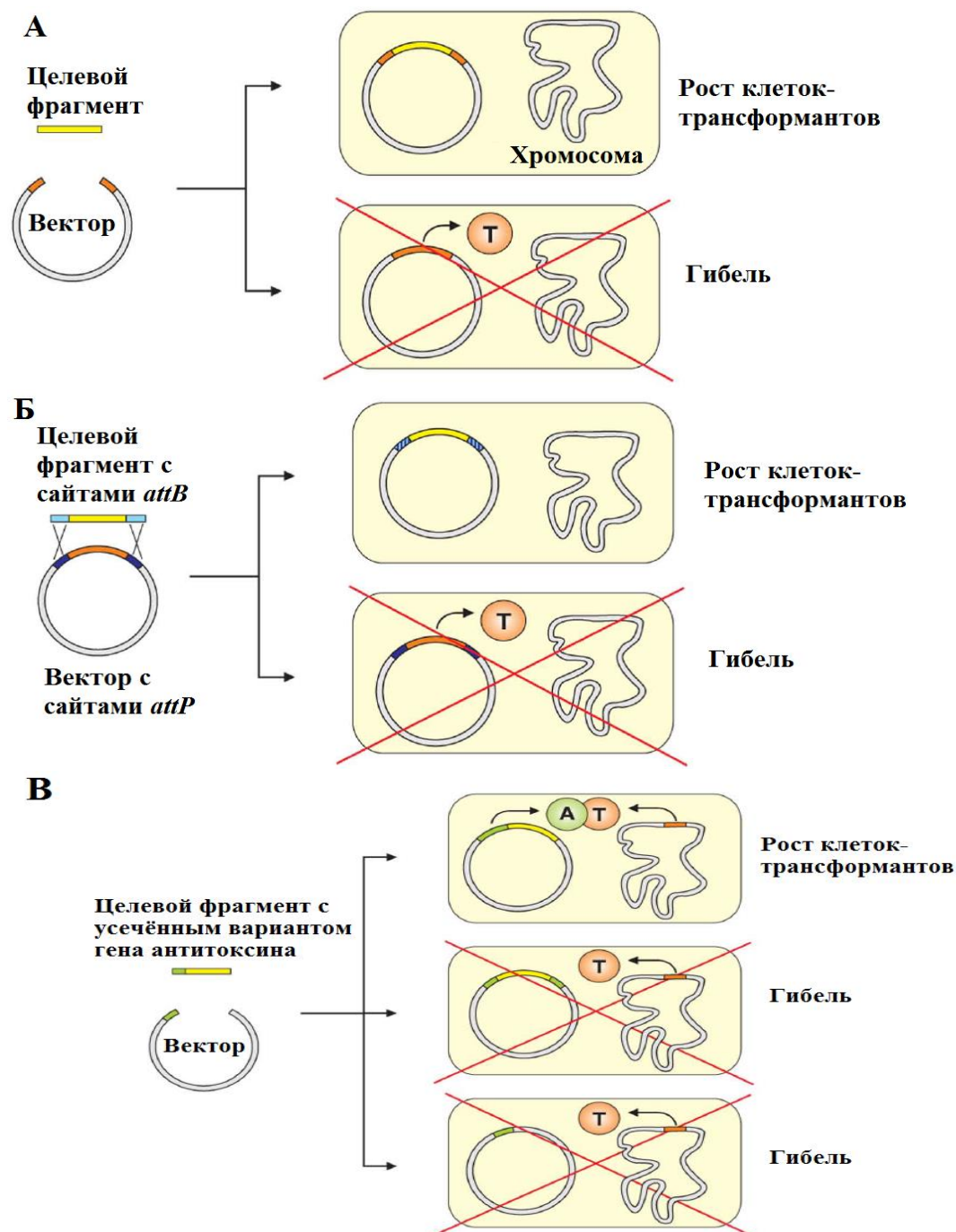


Рисунок 1.4.1.1. Применение систем ТА в клонировании ДНК. (А) - Вставка гена интереса приводит к разрушению гена токсина, что способствует выживанию бактериальных клеток. (Б) – Принцип функционирования системы Gateway cloning (В) – Принцип функционирования системы StabyCloning. [Адаптировано из Unterholzner et al., 2013].

Системы ТА также могут применяться для обеспечения наработки целевых белков [Srivastava et al., 2021]. В данном случае используется токсин MazF. MazF – эндорибонуклеаза, осуществляющая деградацию мРНК по сайту АСА [Unterholzner et al., 2013]. В связи с этим ген интереса оптимизируют таким образом, чтобы его последовательность не содержала сайт АСА, после чего данный ген экспрессируется с токсином [Srivastava et al., 2021]. В результате бактериальными клетками будет синтезироваться только белок, интересующий исследователя [Kamruzzaman et al., 2020].

1.4.2. Применение систем ТА в терапии инфекционных заболеваний

Наиболее важной областью применения систем ТА может стать терапия инфекционных заболеваний [Lee, 2016], которая будет рассмотрена ниже.

1.4.2.1. Системы ТА в антибактериальной терапии

Модули ТА играют важную роль в физиологии бактериальной клетки и могут рассматриваться в качестве новых, потенциально эффективных биомишеней [Srivastava et al., 2021]. Неоспоримыми преимуществами систем ТА как биомишеней является их распространенность в геномах практически всех прокариот и отсутствие гомологов в геноме человека [Rownicki et al., 2020].

В настоящее время предлагается несколько возможных подходов к проведению терапии, основанной на модулях ТА II типа, поскольку системы ТА данного типа широко распространены и наиболее полно изучены [Unterholzner et al., 2013]. Каждый из рассматриваемых подходов предполагает воздействие на разные компоненты систем ТА, которое приведёт к активации токсина и, в конечном счёте, к гибели клетки [Rownicki et al., 2020]. Выделяют прямые и непрямые (косвенные) методы активации токсинов [Lee, 2016].

Прямые методы предполагают непосредственное воздействие на главные белки систем ТА – токсин и антитоксин [Lee, 2016]. К таким методам относятся: разрушение комплекса ТА и предотвращение формирования комплекса ТА [Rownicki et al., 2020].

Подход, связанный с разрушением комплекса ТА, предполагает использование высокоаффинных пептидных ингибиторов, которые взаимодействуют с антитоксином, вытесняя токсин из комплекса, что приводит к его активации [Rownicki et al., 2020]. Данный метод был использован в различных исследованиях [Unterholzner et al., 2013]. Примерами являются работы, посвящённые участию VarB и VarC-подобных пептидов в расщеплении комплексов ТА VarBC26 [Kang et al., 2017] и VarBC30 [Lee et al., 2015] *M. tuberculosis* с последующим высвобождением и активацией рибонуклеаз VarC26 и VarC30, соответственно [Rownicki et al., 2020].

Ещё одним эффективным методом прямой активации систем ТА является ингибирование трансляции антитоксина [Srivastava et al., 2021]. Для этого используются специальные антисенс-пептидонуклеиновые кислоты, которые связываются с мРНК антитоксина, тем самым ингибируя синтез белка антитоксина [Rownicki et al., 2020]. При этом количество токсина не меняется, это приводит к его накоплению и воздействию на различные клеточные мишени [Rownicki et al., 2018].

Непрямые методы активации систем ТА предполагают воздействие на другие клеточные компоненты, функции которых связаны с системами ТА [Rownicki et al., 2020].

Одним из непрямых методов активации систем ТА является активация клеточных протеаз, деградирующих антитоксины [Unterholzner et al., 2013]. Это приводит к высвобождению и восстановлению функциональной активности токсина и, в конечном счёте, к гибели клетки [Srivastava et al., 2021].

Другой непрямой метод - ингибирование транскрипции генов системы ТА [Lee, 2016] – предполагает индукцию связывания молекул ингибитора с промотором оперона [Unterholzner et al., 2013]. Это приводит к подавлению экспрессии обоих генов модуля и, как следствие, синтеза соответствующих белков [Lee, 2016]. Кроме новосинтезированных, в бактериальной клетке также присутствуют образованные ранее токсины и антитоксины, сформировавшие комплекс друг с другом [Kamruzzaman et al., 2020]. Менее стабильные антитоксины со временем деградируют, что приводит к накоплению активных токсинов и, как следствие, к гибели бактериальной клетки [Kang et al., 2018].

Против бактерий, у которых гены систем ТА локализованы в плаزمиде, также может быть применён метод, связанный с индукцией утраты плазмиды, несущей гены систем ТА [Unterholzner et al., 2013]. Эффект сходен с таковым при постсегрегационной клеточной гибели [Kamruzzaman et al., 2020].

Кроме того, активация систем ТА может быть осуществлена за счёт использования факторов чувства кворума у бактерий [Rownicki et al., 2020]. Данный подход предполагает воздействие, главным образом, на системы MazEF [Kumar et al., 2014]. Для активации систем ТА используют секретлируемые бактериями пентапептиды – внеклеточные факторы гибели [Kumar et al., 2013]. Пентапептиды связываются непосредственно с токсином, препятствуя его взаимодействию с антитоксином, что приводит к активации токсина [Rownicki et al., 2020].

Наконец, ещё один непрямой метод активации связан с заражением бактериальной клетки умеренным бактериофагом, несущим рекомбинантную РНК или ДНК, которая кодирует токсин

[Srivastava et al., 2021]. Рекомбинантная ДНК или РНК конструируется таким образом, чтобы с кодируемым ей белком токсина, не мог связаться бактериальный антитоксин [Lee, 2016]. При заражении бактериофагом РНК или ДНК токсина проникает в бактериальную клетку и встраивается в геном бактерии в лизогенном цикле [Rownicki et al., 2020]. Синтезируется рекомбинантный белок токсина, который воздействует на различные структуры бактериальной клетки, приводя её к гибели [Srivastava et al., 2021].

Одним из примеров возможного применения систем ТА в антибактериальной терапии является использование системы ТА MbcAT (Rv1990c-1989c) в терапии туберкулёза (в т.ч. против антибиотикоустойчивых форм) [Torfs et al., 2019]. MbcA – антитоксин, MbcT – токсин, являющийся высокоэффективной НАД-фосфорилазой, катализирующей деградацию НАД [Freire et al., 2019]. В отсутствие антитоксина токсин MbcT способен индуцировать гибель *M. tuberculosis* за счёт резкого снижения уровня внутриклеточного НАД [Torfs et al., 2019]. В качестве возможных подходов использования данной системы ТА в терапии туберкулёза предлагается либо разрушение комплекса MbcTA за счёт использования малых молекул-ингибиторов, либо инактивация антитоксина MbcA [Freire et al., 2019].

1.4.2.2. Системы ТА в противовирусной терапии

Системы ТА в перспективе могут использоваться в терапии против ВИЧ [Chan et al., 2015] (Рисунок 1.4.2.2.1.).

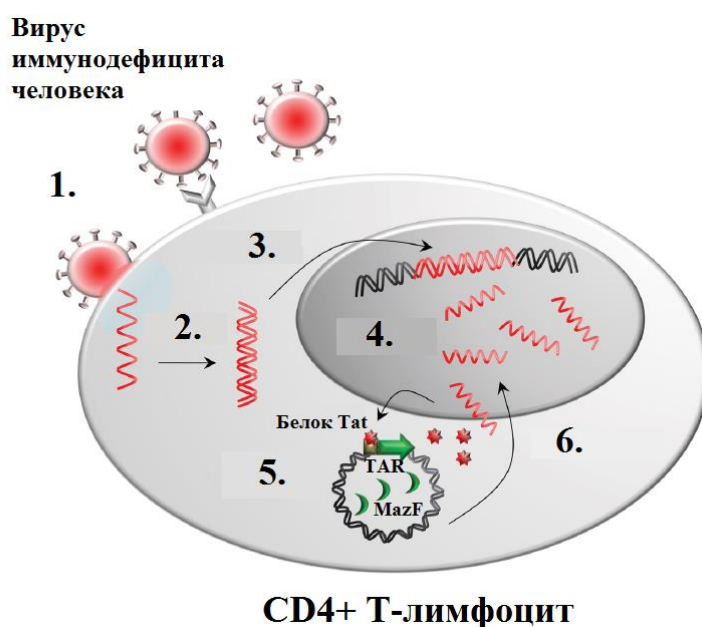


Рисунок 1.4.2.2.1. Терапия против ВИЧ за счёт активации токсина MazF ранним белком вируса [Адаптировано из Chan et al., 2015]. Цифрами обозначены процессы: 1 – Проникновение РНК ВИЧ в клетку; 2 – Обратная транскрипция; 3 – Интеграция в геном клетки-хозяина; 4 – Синтез мРНК ВИЧ; 5 – Связывание белка Tat, кодируемого геномом ВИЧ, с последовательностью TAR векторной системы; 6 – Расщепление вирусных мРНК TAR-зависимым токсином MazF.

Данный подход предполагает использование специальной векторной экспрессионной системы [Unterholzner et al., 2013]. За последовательностью TAR (от transactivation response), с которой связывается белок вируса Tat (от transactivator of transcription), расположен ген токсина *mazF* [Chono et al., 2011]. Токсин MazF является рибонуклеазой, которая расщепляет мРНК [Srivastava et al., 2021]. В ген, кодирующий этот токсин, внесена замена таким образом, чтобы токсин не расщеплял собственные РНК клетки, а был направлен исключительно против вирусных мРНК, тем самым блокируя синтез вирусных белков и дальнейшее распространение вируса [Chan et al., 2015].

Системы ТА могут быть использованы не только в терапии ВИЧ, но и при лечении гепатита С [Srivastava et al., 2015]. В этом случае также используется специализированная экспрессионная система на основе токсина MazF [Chan et al., 2015] (Рисунок 1.4.2.2.2.).

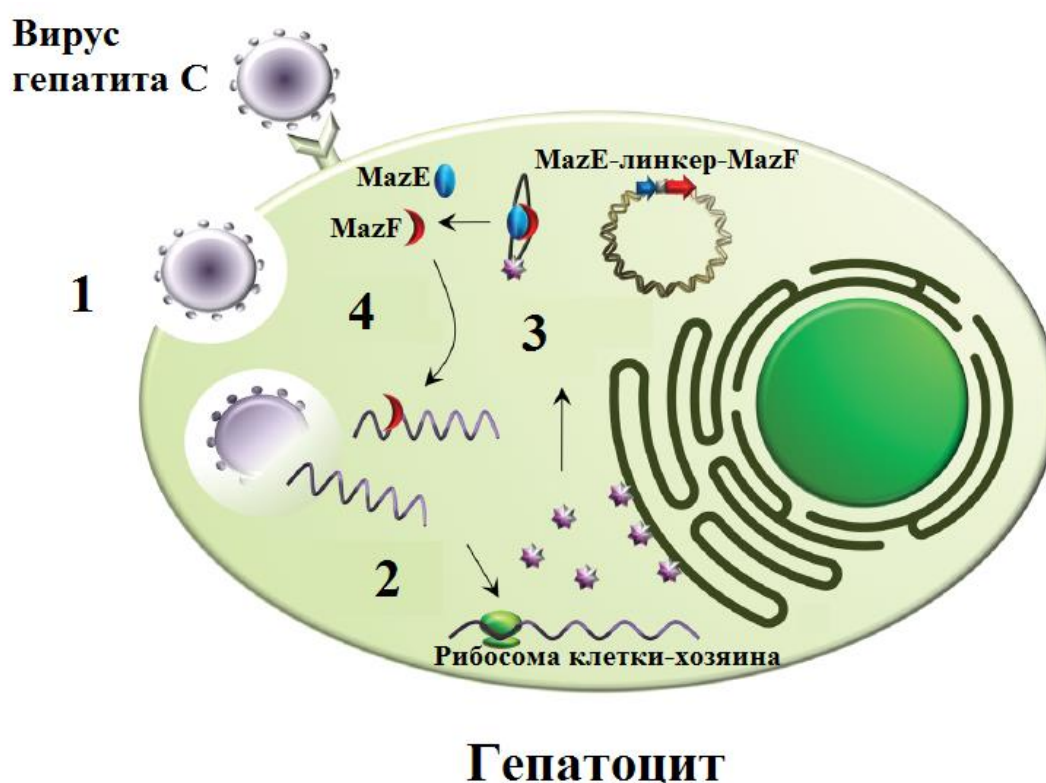


Рисунок 1.4.2.2.2. Терапия против вируса гепатита С за счёт активации токсина MazF [Адаптировано из Chan et al., 2015]. Цифрами обозначены процессы: 1 – проникновение вируса гепатита С в клетку; 2 – Высвобождение и трансляция РНК вируса гепатита С; 3 – Расщепление линкера протеазой вируса гепатита С NS3; 4 – Высвобождение токсина MazF и расщепление вирусных мРНК.

При проникновении вируса гепатита в клетку происходит высвобождение его РНК, которая транслируется в белки на рибосомах бактериальной клетки [Unterholzner et al., 2013]. Один из синтезируемых белков – протеаза [Chan et al., 2015]. Векторная система сконструирована таким образом, чтобы между усеченным геном антитоксина *mazE* и геном токсина *mazF*

находился линкерный участок, идентичный последовательности, распознаваемой вирусной протеазой [Park et al., 2012]. Вирусная протеаза расщепляет эту последовательность, что приводит к высвобождению токсина и его активации [Shapira et al., 2012]. Активный токсин расщепляет вирусные мРНК [Chan et al., 2015].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Работа с бактериальными культурами

2.1.1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

В работе были использованы компетентные клетки *M. smegmatis* mc² 155, *E. coli* DH5 α и нескольких экспрессионных штаммов. Характеристики штаммов представлены в Таблице 2.1.1.1.

Таблица 2.1.1.1. Бактериальные штаммы, использованные в исследовании

Бактериальный штамм или плазмида	Описание	Источник или ссылка
<i>E. coli</i> DH5 α	Штамм для клонирования Генотип: F - Φ 80 Δ lacZAM15 Δ (lacZYA-argF) U169	[Inoue <i>et al.</i> , 1990]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Экспрессионный штамм, содержащий DE3-профаг, с геном РНК-полимеразы T7 под контролем промотора lacUV5, что позволяет индуцировать экспрессию РНК-полимеразы T7 с помощью IPTG. Генотип: F- <i>ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3)</i>	[Studier <i>et al.</i> , 1990]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Экспрессионный штамм, содержащий DE3-профаг, с геном РНК-полимеразы T7 под контролем промотора lacUV5, и плазмиду pLysS, кодирующую лизоцим T7 – естественный ингибитор T7 РНК-полимеразы. Это позволяет подавлять её экспрессию до индукции. Генотип: F- <i>ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)</i>	[Zhang, Studier, 1997]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) CodonPlus	Экспрессионный штамм, дополнительно содержащий дополнительные копии генов tРНК (<i>argU, ileY</i> и <i>leuW</i>), что способствует высокому уровню экспрессии белков, при синтезе которых используются редкие кодоны. Генотип: F- <i>ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ TetR gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW CamR]</i>	[Kleber-Janke, Becker, 2000]

Продолжение Таблицы 2.1.1.1.		
<i>E. coli</i> NiCo21 (DE3)	<p>Экспрессионный штамм, дополнительно экспрессирующий белки SlyD, Can, ArnA, слитые на С-конце с хитин-связывающим доменом, и белок GImS, в котором 6 гистидиновых остатков заменены на аланиновые, что приводит к утрате способности белка связываться с остатками Ni и способствует повышению чистоты целевых His-меченых белков.</p> <p>Генотип: <i>can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i></p>	[Robichon <i>et al.</i> , 2011]
<i>E. coli</i> B834 (DE3)	<p>Экспрессионный штамм, являющийся ауксотрофом по метионину, что способствует высокоспецифичному мечению целевых белков 35S-метионином и селенметионином, также содержит DE3-профаг, с геном РНК-полимеразы T7 под контролем промотора lacUV5.</p> <p>Генотип: <i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm met (DE3)</i></p>	[Berrow <i>et al.</i> , 2006]
<i>M. smegmatis</i> mc2 155	<p>Штамм <i>M. smegmatis</i>, полученный на основе штамма <i>M. smegmatis</i> ATCC 607 в результате спонтанной мутации и характеризующийся повышенной частотой трансформации</p>	[Snapper <i>et al.</i> , 1990]

2.1.2. Среда и антибиотики, использованные в работе

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 применяли среды Middlebrook 7H9 (Himedia, Индия) с добавлением OADC, 7H9 с добавлением 0,05% глюкозы, 7H9 с добавлением 0,1% глицерина; среду Lemco Tween-80 (Lemco TW), а также минимальные среды (состав представлен в Таблице 2.1.2.1.). Для культивирования клеток *M. smegmatis* на твердой среде использовали Триптон-соевый агар M290 (Himedia, Индия).

Таблица 2.1.2.1. Состав сред, использованных в работе

Среда	Состав
Минимальная среда	40 mM K ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,7 mM цитрат Na, 0,4 mM MgSO ₄ , 0,4% глицерин, 0,05% Tween-80
Минимальная среда без азота	40 mM K ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 1,7 mM цитрат Na, 0,4 mM MgSO ₄ , 0,4% глицерин, 0,05% Tween-80
Минимальная среда без углерода	40 mM K ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,7 цитрат Na, 0,4 mM MgSO ₄ , 0,05% Tween-80
Lemco-Tween	На 1 л среды: 5 г пептон (Oxoid, Великобритания), 5 г порошок Lab Lemco (Oxoid, Великобритания), 5 г NaCl.

При необходимости добавляли антибиотики. Для культуры *E. coli* штаммов DH5 α , BL21 и B834 в среды добавляли 50 мкг/мл канамицина (Биохимик, Россия), либо 150 мкг/мл ампициллина (Синтез, Россия) (в зависимости от используемой векторной плазмиды: рЕТ28а, или рЕТ32а, соответственно). При культивировании *E. coli* рLysS 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).

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

Клетки *E. coli* инкубировали в 10 мл среды LB в течение ночи (~16-18 часов) при 37°C и перемешивании при 250 об/мин. Затем клетки разбавляли в 50 раз в 10 мл стерильной среды LB (до OD₆₀₀=0,05) и инкубировали при 37°C и перемешивании (200-250 об/мин) в течение 1,5-2 часов до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,15. После этого охлаждённые клетки центрифугировали при 5800*g и +4°C в течение 10 минут. Затем удаляли надосадочную

жидкость, а осадок ресуспендировали в 5 мл 0,1 М охлаждённого 0,1 М раствора CaCl_2 и инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 40 минут. По окончании инкубации снова осаждали центрифугированием при $5800 \times g$ и $+4^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в 1 мл охлаждённого 0,1 М раствора CaCl_2 , инкубировали 1,5 часа, после чего добавляли стерильный охлаждённый глицерин до достижения конечной концентрации 10%. Далее из полученной суспензии отбирали аликвоты объёмом по 200 мкл, помещали их в предварительно охлаждённые стерильные микропробирки и замораживали при -80°C .

2.1.4. Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Компетентные клетки размораживали в ледяной бане в течение 10-15 минут. Затем к суспензии клеток добавляли 10-15 мкл лигазной смеси (в расчёте на 200 мкл клеточной суспензии), либо 1 нг плазмидной ДНК (положительный контроль). После этого клетки инкубировали во льду в течение 45 минут. Далее клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 1,5 минут. После проведения теплового шока компетентные клетки помещали в ледяную баню на 7-8 минут, затем к суспензии клеток добавляли 1 мл стерильной среды LB и инкубировали в термостате при 37°C в течение 60 минут. По окончании инкубации суспензию клеток центрифугировали при $7000 \times g$ в течение 2 минут, после чего удаляли 1 мл супернатанта и ресуспендировали осадок. Полученную суспензию растирали шпателем на чашки с агаризованной LB, содержащей в качестве селективного агента необходимый антибиотик.

2.1.5. Получение электро-компетентных клеток *M. smegmatis*

10 мл среды 7Н9 инокулировали петлей клетками *M. smegmatis*, после чего выращивали при 37°C и 250 об/мин в течение 16-18 часов. Далее суспензию разбавляли стерильной средой 7Н9 до конечного объёма 250 мл и выращивали в тех же условиях 16-24 часов до достижения $\text{OD}_{600}=1,0-1,2$. Затем клетки инкубировали 1,5 часа на ледяной бане ($+4^\circ\text{C}$), после чего осаждали центрифугированием при $3000 \times g$ и $+4^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. Далее клетки *M. smegmatis* трижды промывали предварительно охлаждённым стерильным 10% раствором глицерина, постепенно уменьшая объём (50-25-12,5 мл). После каждой отмывки клетки собирали центрифугированием при $3000 \times g$ и $+4^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. Затем для достижения максимальной концентрации клетки ресуспендировали в 2,5 мл (1/100 от первоначального объёма культуры) охлаждённого 10% глицерина. Полученную суспензию делили на аликвоты по 200 мкл, помещали в заранее охлаждённые микропробирки и замораживали при -80°C .

2.1.6. Электротрансформация компетентных клеток *M. smegmatis*

Трансформацию *M. smegmatis* осуществляли методом электропорации. Для этого компетентные клетки размораживали на водяной бане в течение 15 минут, после чего

осуществляли центрифугирование при 3000*g и +4°C в течение 10 минут с последующим удалением старого глицерина и добавлением нового, 10% стерильного глицерина. Далее к 200 мкл компетентных клеток добавляли ДНК в количестве 0,5-5 мкг, но не более 5 мкл по объёму и инкубировали во льду в течение 10 минут. После этого клеточную суспензию переносили в предварительно охлажденную кювету с шириной стенки 0,2 см и инкубировали на льду в течение 10 минут. По окончании инкубации кювету с суспензией компетентных клеток помещали в электропоратор «Bio-Rad MicroPulser» (Bio-Rad, США) и подавали импульс 2,5kV, 25µF при сопротивлении 1000 Ом. После подачи импульса кювету переносили в лёд на 10 минут. По истечении данного времени клеточную суспензию переносили в пробирки с 1 мл 7Н9 и инкубировали 3 часа при t=37°C. По окончании инкубации отбирали 100 мкл клеточной суспензии и засеивали на чашки со средой M290, содержащей селективный маркер. Оставшуюся клеточную суспензию центрифугировали при 3000*g в течение 10 минут, затем отбирали 900 мкл супернатанта, ресуспендировали осадок и высевали на чашки со средой M290. Чашки с трансформантами *M. smegmatis* инкубировали при t=37°C до появления отдельных колоний (3 дня).

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

Для оценки скорости роста штаммы *M. smegmatis* mc² 155, Δ*vapBC2*, Δ*vapB2*, Δ*vapC2*, 2**vapB2*, 2**vapC2*, pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int+*vapC46* w.t. и pKW08-MCS-Int+*vapC46* C₁₁₃G инкубировали в среде Lemco-Tween до OD₆₀₀=1,5-1,8. После этого культуры pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int+*vapC46* w.t. и pKW08-MCS-Int+*vapC46* C₁₁₃G разбавляли до OD₆₀₀~0,05 свежей средой Lemco-Tween, содержащей гигромицин в концентрации 50 мкг/мл (селективный маркер) (Invitrogen, США) и тетрациклин в концентрации 20 нг/мл (индуктор транскрипции) (Sigma, США), и инкубировали при 37°C и 250 rpm. Общее время инкубации составляло 44 ч.

Штаммы *M. smegmatis* mc² 155, Δ*vapBC2*, Δ*vapB2*, Δ*vapC2*, 2**vapB2*, 2**vapC2* и pKW08-MCS-Int разбавляли до OD₆₀₀~0,05 свежими средами 7Н9 с добавлением 0,05% глюкозы или 0,1% глицерином. В среду со штаммами 2**vapB2*, 2**vapC2* и pKW08-MCS-Int добавляли гигромицин (Invitrogen, США) до достижения конечной концентрации 50 мкг/мл и тетрациклин (в концентрации 20 нг/мл). Инкубацию осуществляли при 37°C и 250 rpm. в течение 44 ч.

2.1.8. Оценка лекарственной чувствительности штаммов *M. smegmatis* методом определения минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков (МИК)

Оценку величины МИК осуществляли в жидкой среде 7Н9 с использованием 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием. При исследовании влияния системы TA *VapBC2* *M.*

smegmatis на лекарственную чувствительность были использованы антибиотики класса аминогликозидов (канамицин) (Биохимик, Россия), макролидов (эритромицин) (Синтез, Россия), ансамицинов (рифампицин) (Sigma, США) и фторхинолонов (офлоксацин) (Синтез, Россия). При исследовании участия системы TA VarBC46 *M. tuberculosis* в регуляции лекарственной устойчивости были использованы эритромицин (Синтез, Россия), рифампицин (Sigma, США) и офлоксацин (Синтез, Россия). Концентрации антибиотиков представлены в Таблице 2.1.8.1. Инкубацию осуществляли до проявления видимого роста культуры. Анализ роста штаммов осуществляли после 72 ч инкубации. В качестве МИК рассматривалась наименьшая концентрация антибиотика, при которой отсутствовал видимый рост культуры.

Таблица 2.1.8.1. Антибиотики, использованные для определения МИК

Антибиотики	Эритромицин	Канамицин	Рифампицин	Офлоксацин
Концентрация, мкг /мл	2	0,0008	1	0,01
	4		2	0,02
	8	0,0015	3	0,04
	10		4	0,08
	12	0,0030	5	0,16
	16		6	0,32
	32	0,0060	8	0,64
	40	0,0125	16	1,28
	50	0,0250		1,92
	64	0,05	32	2,56
	80	0,1		3,2
5,12				

2.1.9. Оценка жизнеспособности трансформантов *M. smegmatis*, несущих ген *varC46* и его мутантный вариант *varC46* C₁₁₃G, в условиях стресса, связанного с лимитированием источников азота и углерода

Проведение стресса, связанного с лимитированием источников азота и углерода, осуществляли по модифицированной методике Davis и Mingioli (1950). Трансформантов *M.*

smegmatis выращивали в среде Lemco-Tween с добавлением гигромицина (плазмидный селективный маркер) (Invitrogen, США) в концентрации 50 мкг/мл, а также тетрациклина в концентрации 20 нг/мл (Invitrogen, США) в качестве индуктора до достижения $OD_{600}=1,5$, после чего разбавляли культуру в 100 раз в 10 мл минимальной среды, минимальной среды без азота и минимальной среды без углерода. Состав минимальных сред представлен в Таблице 2.1.2.1. Далее трансформантов *M. smegmatis* инкубировали в течение 140 ч при $t=37^{\circ}\text{C}$ и 250 об/мин. Через 16 и 24 и 140ч инкубации осуществляли измерение оптической плотности (OD_{600}) и засев на чашки с твёрдой средой M290 для последующего подсчёта числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Чашки с анализируемыми культурами инкубировали при $t=37^{\circ}\text{C}$ до появления отдельных колоний (3 суток).

2.1.10. Проведение окислительного стресса

Для проведения окислительного стресса была использована перекись водорода (H_2O_2). Культура в логарифмической фазе роста ($OD_{600}=0,8-1,0$) была разведена в 100 раз в среде и культивирована до $OD_{600}=0,2-0,4$. Далее в культуру клеток добавляли 0,5 mM H_2O_2 и образцы инкубировали в течение 2 ч. После 10 мин, 30 мин, 1 ч. и 2 ч. инкубации осуществлялся забор проб для измерения OD_{600} и засева на чашки со средой M290 для дальнейшего подсчёта числа КОЕ. Более длительная инкубация не представляет необходимости, т.к. согласно экспериментальным данным, перекись водорода разлагается при инкубации более 3 часов. В качестве контроля использовали образцы, в которые не добавляли H_2O_2 .

2.2. Работа с нуклеиновыми кислотами

2.2.1. Плазмидные векторы, использованные в работе

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

- экспрессионные плазмидные векторы рЕТ28а и рЕТ32а (Рисунки 2.2.1.1 – 2.2.1.2.) были использованы для клонирования и экспрессии генов токсинов *varC46* *M. tuberculosis* и *varC2* *M. smegmatis* с целью наработки белков в экспрессионных штаммах *E. coli*;

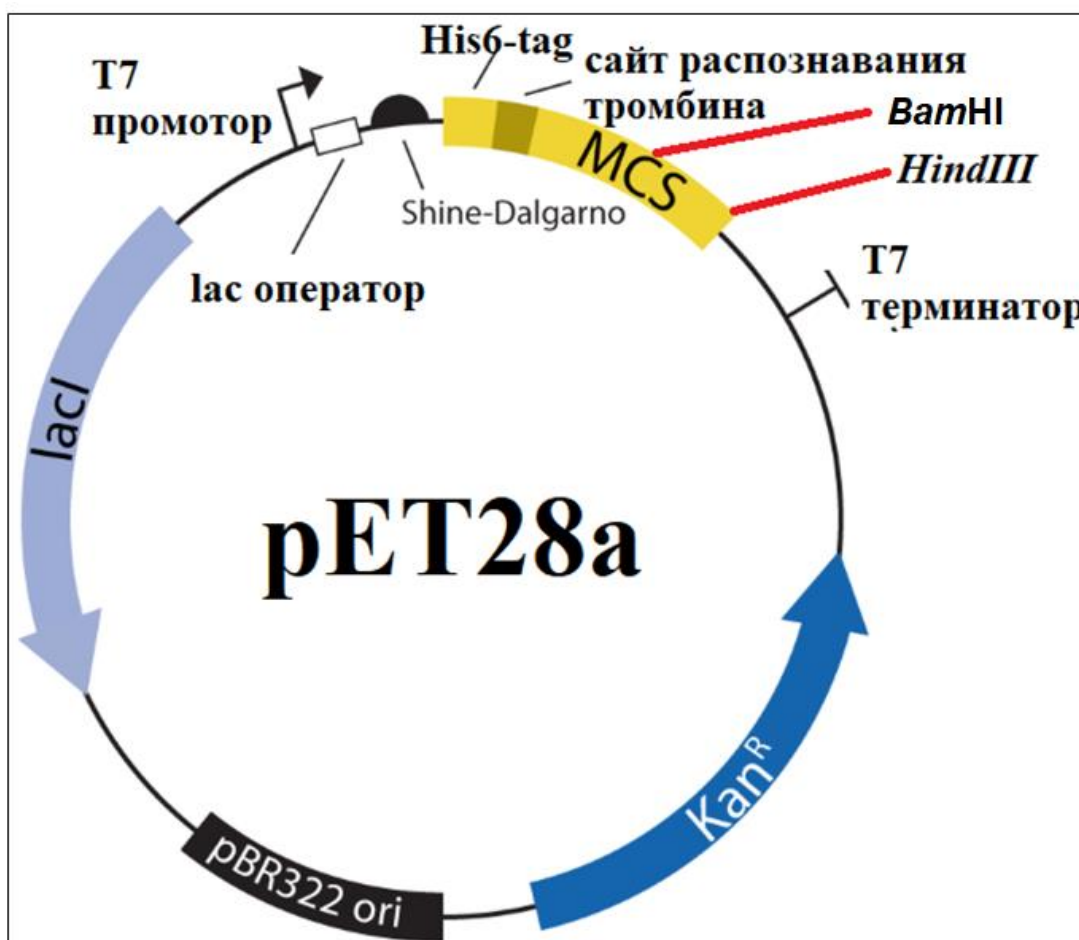


Рисунок 2.2.1.1. Карта экспрессионного вектора рЕТ28а. На рисунке обозначены: His6-Tag – полигистидиновая последовательность; MCS – полилинкерная последовательность; *Hind*III, *Bam*HI – сайты, по которым осуществлялось клонирование гена *varC2* в векторную плазмиду; последовательности промотора и терминатора бактериофага T7; *Kan*^R – ген, кодирующий аминогликозид-3'-фосфотрансферазу, обеспечивающую устойчивость к канамицину; pBR322 ori - точка начала репликации в *E. coli* из плазмиды pBR322; *lacI* – ген, кодирующий репрессор лактозного оперона; lac оператор – последовательность, с которой связывается репрессор *lacI*.

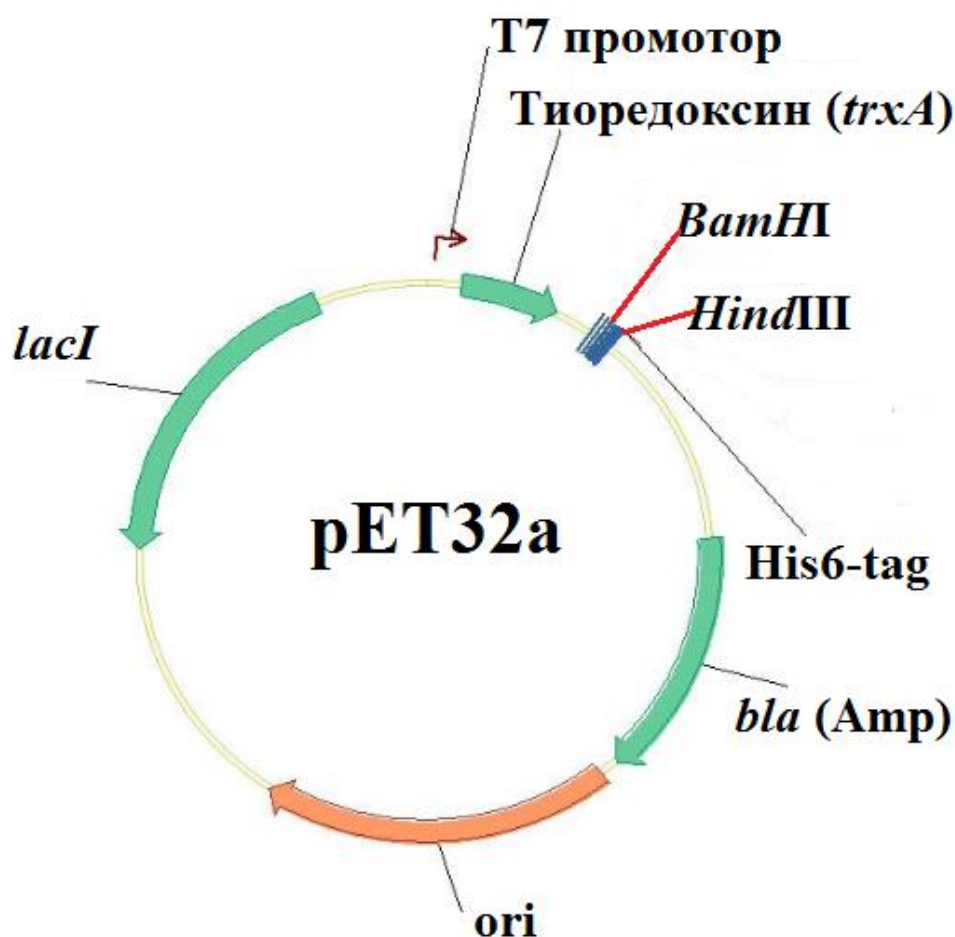


Рисунок 2.2.1.2. Карта экспрессионного вектора pET32a. На рисунке обозначены: *trxA* – ген, кодирующий тиоредоксин *E. coli*; His6-Tag – полигистидиновая последовательность; *Hind*III, *Bam*HI – сайты, по которым осуществлялось клонирование гена *vapC2* в векторную плазмиду, последовательность промотора бактериофага T7; *bla* (Amp) – ген, кодирующий бета-лактамазу, обеспечивающую устойчивость к ампициллину; *ori* – точка начала репликации в *E. coli*; *lacI* – ген, кодирующий репрессор лактозного оперона.

- челночный интегративный вектор pKW08-MCS-Int (Рисунок 2.2.1.3.) применяли для клонирования и экспрессии генов токсинов *vapC46 M. tuberculosis* и *vapC2 M. smegmatis* с целью анализа стресс-адаптивных характеристик полученных трансформантов *M. smegmatis*;

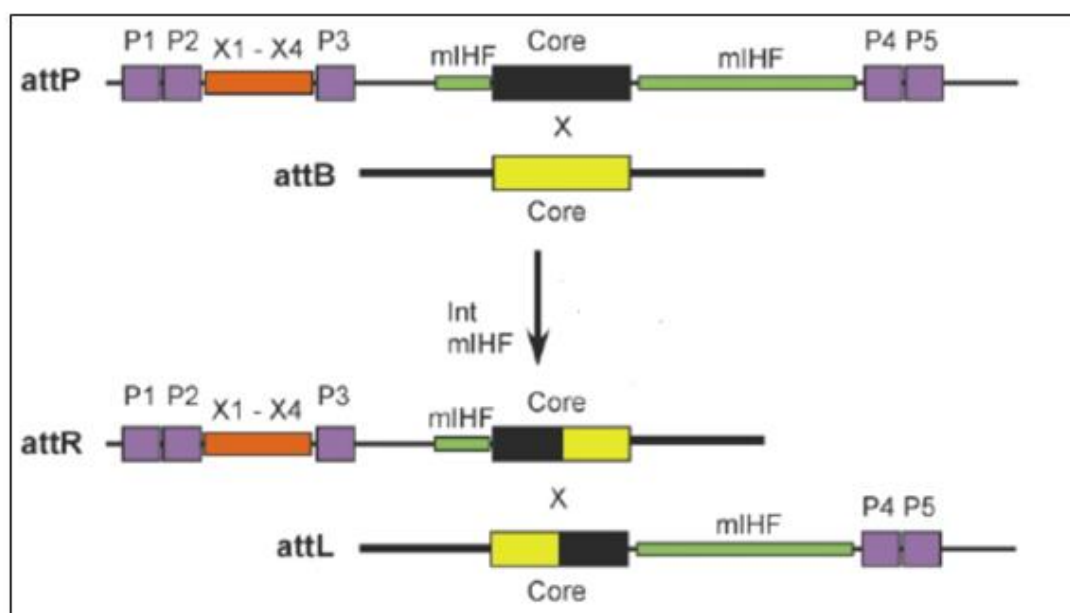
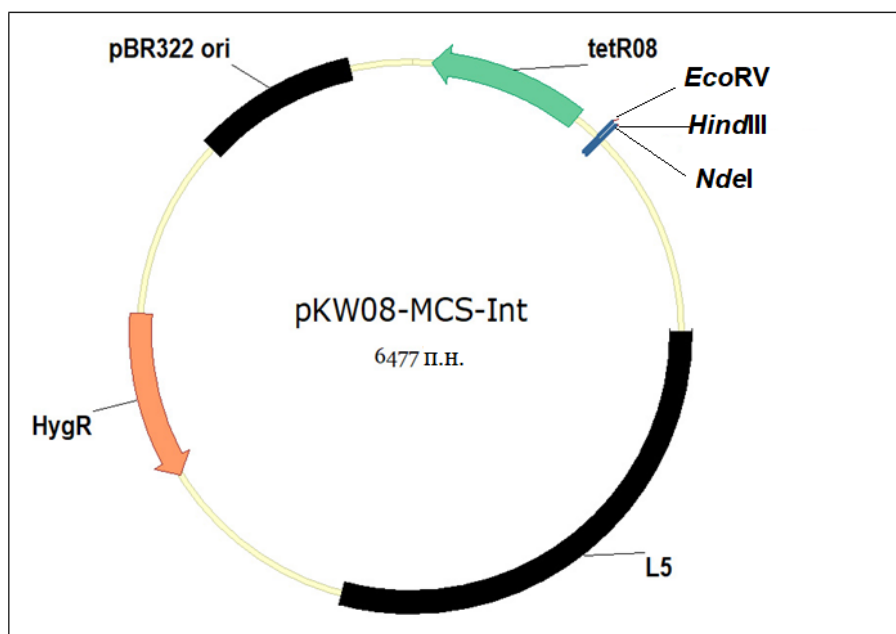


Рисунок 2.2.1.3. Плазмидный вектор pKW08-MCS-Int. (А) – Карта вектора pKW08-MCS-Int. На рисунке обозначены: pBR322 - сайт инициации репликации в *E. coli*, *HygR* – ген, кодирующий гиромидин-В-фосфотрансферазу из *Streptomyces hygroscopicus*, *EcoRV*, *HindIII*, *NdeI* - уникальные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, по которым осуществлялось клонирование в векторную плазмиду; *tetR08* – репрессор из плазмиды pAG1 *Corynebacterium glutamicum*, ингибирующий транскрипцию гена транспортера тетрациклина; L5 - ген интегразы бактериофага L5. (Б) – Схема интеграции вектора pKW08-MCS-Int в хромосому *M. smegmatis* (Адаптировано из Lewis et al., 2003). На схеме обозначены: *attP* – сайт, внутри которого осуществляется рекомбинация бактериофага L5; *attB* – сайт, внутри которого осуществляется рекомбинация *M. smegmatis*. *attP* и *attB* содержат сайты, связывающие интегразу (обозначены как чёрные и жёлтые прямоугольники, соответственно), внутри которых осуществляется сайт-специфическая рекомбинация. Центральная часть *attP* фланкирована интегразы-связывающими сайтами P1-P5. Ключевую роль в процессе рекомбинации играют пары сайтов P1/P2 и P4/P5. Сайт P3 не является существенным. X1-X4 – сайты, с которыми связывается белок Xis. Для прохождения процесса рекомбинации требуется интегразы (Int) и микобактериальные белки (mIHF). Микобактериальные белки mIHF при наличии интегразы связываются с участками *attP*, *attL* и *attR* (обозначены зелёными прямоугольниками).

- система векторных плазмид p2NIL-pGOAL19 для получения делеционных мутантов *M. smegmatis* (Рисунки 2.2.1.4.-2.2.1.5.).

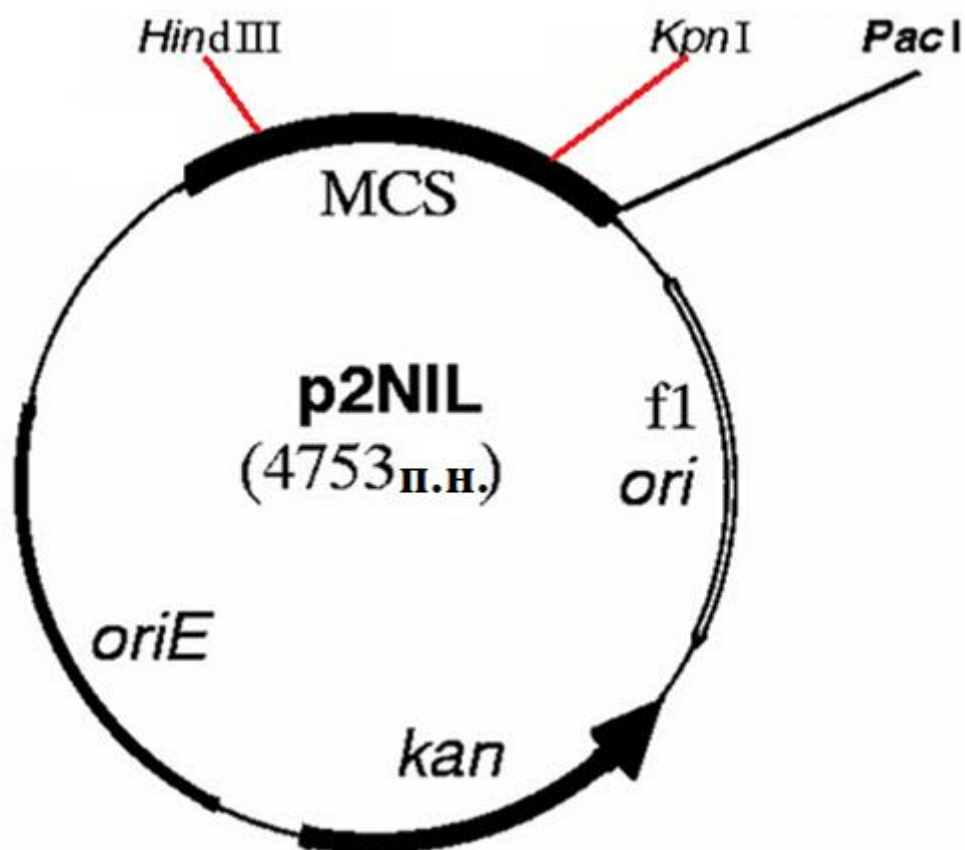


Рисунок 2.2.1.4. Карта векторной плазмиды p2NIL. На рисунке обозначены: f1 ori – точка начала репликации бактериофага f1; MCS – полилинкерная последовательность сайтов эндонуклеаз рестрикции, включающая в себя сайты *Hind*III, *Kpn*I, *Pac*I; oriE – точка начала репликации в *E. coli*; *Hind*III, *Kpn*I – уникальные сайты рестрикции, по которым осуществлялось клонирование генов модуля *varBC2* *M. smegmatis*; *kan* - ген, кодирующий аминогликозид-3'-фосфотрансферазу, обеспечивающую устойчивость к канамицину.

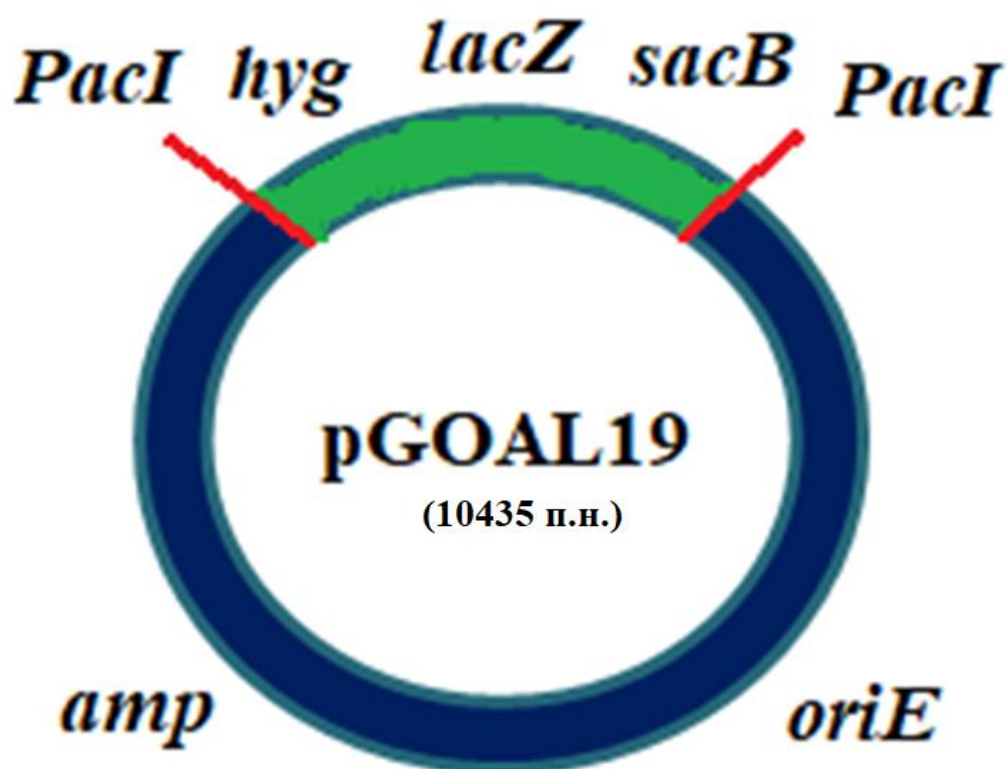


Рисунок 2.2.1.5. Карта векторной плазмиды pGOAL19. На рисунке обозначены: *oriE* – точка начала репликации в *E. coli*; *amp* – ген, кодирующий бета-лактамазу, обеспечивающую устойчивость к ампициллину; *PacI* – уникальные сайты эндонуклеазы рестрикции; *hyg* – ген, кодирующий гигромицин-В-фосфотрансферазу, обеспечивающую устойчивость к гигромицину; *lacZ* – ген, кодирующий β-галактозидазу; *sacB* – ген, кодирующий леваназу, участвующую в превращении сахарозы в метаболит, токсичный для бактериальной клетки.

Характеристики всех использованных в работе векторных плазмид представлены в Таблице 2.2.1.1

Таблица 2.2.1.1. Плазмидные векторы, использованные в исследовании

Плазмида	Описание	Источник или ссылка
pET28a	Вектор для экспрессии гистидин-меченых белков, содержащий T7 промотор, lac оператор, последовательность, кодирующую полигистидин (His6), сайт распознавания тромбина	Novagen
pET32a	Экспрессионный вектор, содержит T7 промотор, lac оператор, последовательность, кодирующую полигистидин (His6), сайт распознавания тромбина и последовательность, кодирующую тиоредоксин	Novagen
Продолжение Таблицы 2.2.1.1		

pKW08-MCS-Int	Челночный интегративный вектор, модификация плазмиды pKW08 Lx со вставкой полилинкера	[Williams <i>et al.</i> , 2010], [Bekker O. B., Maslov D. A., неопубликованные данные]
p2NIL	Вектор для клонирования, который реплицируется только в <i>E.coli</i>	[Parish, Brown, 2009]
pGOAL19	Плазида, несущая кассету маркерных генов (<i>hyg</i> , <i>lacZ</i> , <i>sacB</i>), фланкируемую сайтом рестрикции <i>PacI</i>	[Parish, Brown, 2009]

2.2.2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы биотехнологической компанией «Евроген». Их последовательности представлены в Таблице 2.2.2.1. 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 созданы с использованием программы Oligo 7.

Таблица 2.2.2.1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Цель	Название	5'-3' последовательность
Праймеры для клонирования	MSMEG_6760 F	TCA TCT CAT CCG AAC CGC TC
	MSMEG_6760 R	CCA GCA CCA GCT CGA TGA TTA
	pKW_6760-F	<i>EcoRV</i> ↓ GAC AGA T <u>AT</u> CCG GAG GAA ATG TTA TGT TAT GCC CGT GAC CGA TGT GAA AC
	pKW_6760-R	<i>HindIII</i> ↓ ATG CA <u>A</u> GCT TTT ATC ACG CAG TGA GCA GTG AGC AGC GCG
	MSMEG_6762 F	<i>EcoRV</i> ↓ TTT TGA T <u>AT</u> CGT ACG TTG TGT GGG TGA CCG
	Продолжение Таблицы 2.2.2.1	

	MSMEG_6762 R	<i>Hind</i> III ↓ TTT TA <u>A GCT</u> TTT CAC ATC GGT CAC GGG CAT
	pET-vapC2 F	<i>Bam</i> HI ↓ TTT TG <u>G ATC</u> CGA CAT GCC CGT GAC CGA TG
	pET-vapC2 R	<i>Hind</i> III ↓ TTT TA <u>A GCT</u> TTC ACG CAG TGA GCA GCG CG
	pET-vapC46 F	<i>Bam</i> HI ↓ TTT TG <u>G ATC</u> CAT GGC GGC CAT CTA TCT CGA C
	pET-vapC46 R	<i>Hind</i> III ↓ TTT TA <u>A GCT</u> TTC ACG ACG GGG CGA TCA CG
	pET28a-tig sm F	<i>Nco</i> I ↓ <u>C CA TGG</u> ATG CAA GTT TCA GTT GAA ACC ACT CAA G
	pET28a-tig R	<i>Nco</i> I ↓ <u>C CA TGG</u> CGA AAA CCT GTA TTT TCA GGG CCG CCT GCT GGT TCA TCA GCT CG
	pKW-vapC46 F	<i>Nde</i> I ↓ GAC <u>ACA TAT</u> GGG AGG AAA TGT TAT GGC GGC CAT CTA TCT CGA
	pKW-vapC46 R	<i>Hind</i> III ↓ TTT TA <u>A GCT</u> TTC ACGACG GGG CGA TCA C
Праймеры для проведения сайт-направленного мутагенеза	MSMEG_6760-62n F	TTT TAA GCT TTG CCC CCG GGA AAA TGG TGG
	MSMEG_6760-62n R	TTT TGG TAC CCT GGG CCG TGC AAG GAC ACT
	del vapB2 F	Pi * - GAC ATG CCC GTG ACC GAT GTG AAA
	del vapBC2 R	Pi * - GGT CAC CCA CAC AAC GTA CAA CCA TC
	del vapBC2 F	Pi * - TCC GCG GTG TAA TCA TCG AGC TG
	del vapC2 R	Pi * - ATG TCA GTC CTC CTT GAG CGG TTC
Праймеры для проведения ПЦР в реальном времени	polA- F	GGT CTG GTT GAA CGT CGT GTG GAT G
	<i>Продолжение Таблицы 2.2.2.1</i>	
	polA-R	GCT GGA GAT GCC GAA GAC CAA GAA G

	MSMEG_6760-6762 F	GTG ACC GTG ATC GAC GAG GA
	MSMEG_6760-6762 R	CAG CTC GAT GAT TAC ACC GC
	MSMEG_6760(2)-F	CGA TCT GGT TGA TGG CCG ACG A
	MSMEG_6760(2)-R	ATG AAC CGC ACA GCT TCT CGT TCC
	MSMEG_6762 F	TTT TGA TAT CGT ACG TTG TGT GGG TGA CCG
	MSMEG_6762 R	TTT TAA GCT TTT CAC ATC GGT CAC GGG CAT
	MSMEG_6760 F	TTT TGA TAT CAT GCC CGT GAC CGA TGT GA
	MSMEG_6760 R	TTT TAA GCT TTC GAT GAT TAC ACC GCG GAC
	MSMEG_6764 F	TTG GCA GAG TTG GGC ACG C
	MSMEG_6764 R	GGA TGA CCT CGA CGC TGA TGG
	MSMEG_5244 F	GAA CTG GAC GTC ATC GGC GA
	MSMEG_5244 R	TGA ACG ACG TGA GCA TCA GG
	MSMEG_3944 F	ATC AAG GGC ATG GAC CTC AC
	MSMEG_3944 R	GTT CGG CGA TCT GCT TGT TG
Праймеры для проведения секвенирования ДНК <i>M. smegmatis</i>	varBC2-seq F	GAC GAT TCC TGG ACG CTC AT
	varBC2-seq R	GTG CTC GGG TGG AGT CAG
	pET28a-T7 F	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG
	pET28a-T7 R	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

* P_i – обозначен остаток фосфата на 5'-конце праймера

2.2.3. Амплификация ДНК

Амплификацию фрагмента ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием прибора Thermal Cycler T 100 (BioRad, США). Амплификацию модуля *varBC2*, генов *varB2* и *varC2* осуществляли с геномной ДНК *M. smegmatis* mc² 155. Ген *varC46* дикого типа амплифицировали с геномной ДНК *M. tuberculosis* H37Rv. Мутантный вариант *varC46* C₁₁₃G амплифицировали с геномной ДНК, выделенной из одного из клинических

изолятов *M. tuberculosis* Beijing-B0/W148. Геномная ДНК *M. tuberculosis* предоставлена ФГБУН Центральный исследовательский институт туберкулеза, «ЦНИИТ» (Москва, Россия). Для амплификации гена триггер-фактора *E. coli* (*tig*) использовали геномную ДНК *E. coli* DH5 α . Для амплификации генов токсинов *varC46*, *varC2*, антитоксина *varB2* и триггер-фактора *E. coli* (*tig*) и их последующего клонирования в состав векторных плазмид использовали набор Tersus plus PCR kit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Последовательности праймеров для амплификации представлены в Таблице 2.2.2.1.

Конечная реакционная смесь содержала: 10×Tersus plus буфер для ПЦР, содержащий MgCl₂ в конечной концентрации 2,5mM, Σ dNTPs 0,2 mM каждого, смесь ферментов 50×Tersus полимеразы, праймеры по 2 мкМ на 100 мкл смеси, а также матричную ДНК в количестве 50 нг на 100 мкл смеси.

Подбор условий реакции амплификации осуществляли с использованием температурного градиента на приборе Thermal Cycler T 100 (BioRad, США).

Программа амплификации с использованием набора Tersus plus PCR kit (Евроген, Россия):

95°C – 1'		
95°C – 30''	}	
Tm°C – 30''	}	
72°C – 1' (на 1000 п.о.)	}	20-35 циклов
72°C – 5'		

При проведении ПЦР-скрининга колоний трансформантов *E. coli* для проверки наличия вставки генов *varC46*, *varC2* и *tig* использовали набор Bio Taq (DiaLat, Россия). Конечная реакционная смесь содержала: 5× буфер для ПЦР, MgCl₂ 1,5mM, Σ dNTPs 0,2 mM каждого, смесь ферментов из расчета 2 е.а. на 100 мкл смеси, праймеры по 20 мкМ на 100 мкл смеси, а также матричную ДНК в количестве от 20 до 100 нг на 100 мкл смеси. Полученную смесь разливали в пробирки на 0,2 мл по 15 мкл и добавляли по 5 мкл суспензии клеток (отдельные колонии трансформантов *E. coli* предварительно скалывали в 20 мкл стерильной H₂O). Температуру отжига подбирали с учетом длины и состава праймеров.

Подбор условий реакции амплификации смеси проводили с использованием температурного и концентрационного (MgCl₂) градиента на приборе Thermal Cycler T 100 (BioRad, США).

Программа амплификации с использованием набора Bio Taq (DiaLat, Россия).

95°C – 5'	} 25 ЦИКЛОВ
95°C – 30''	
T _m °C – 30''	
72°C – 1' (на 1000 п.о.)	
72°C – 10'	

2.2.4. Получение делеции модуля *varBC2* *M. smegmatis*

Для получения конструкции с модулем *varBC2* и фланкирующим его участком длиной около 1000 п.н., геномная ДНК *M. smegmatis* mc²155 была амплифицирована по праймерам MSMEG_6760-62n F и MSMEG_6760-62n R (Таблица 2.2.2.1). Далее было осуществлено клонирование фрагмента, состоящего из модуля *varBC2* и фланкирующих его «плеч», в векторную плазмиду p2NIL по сайтам рестрикции *KpnI* и *HindIII* (Fast digest, Thermo scientific, США). Для получения делеций, включающих ген токсина ($\Delta varC2$), антитоксина ($\Delta varB2$), либо целый модуль ($\Delta varBC2$), была проведена реакция амплификации с использованием модифицированных праймеров, содержащих остатки фосфата на 5'-конце (Pi) и комплементарных концам делелируемых генов и плечам (Рисунок 2.2.4.1). После этого была проведена реакция лигирования полученных ПЦР-фрагментов. Реакция лигирования проводилась с использованием Т4 ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США). Инкубацию осуществляли при 22°C в течение 18 ч. Для наработки полученной конструкции осуществляли трансформацию компетентных клеток *E. coli* с последующим выделением конструкции. Оценка наличия целевой вставки нужной длины проводилась методом ПЦР-скрининга колоний. Далее осуществлялось выделение целевой конструкции с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия). После этого обрабатывали рестриктазой *PacI* (Thermo Scientific, США) полученную конструкцию и плазмиду pGOAL19. Данный этап необходим для вырезания из pGOAL19 дополнительных селективных маркеров: кассеты устойчивости к гигромицину длиной 2500 п.н., гена *sacB* – чувствительности к сахарозе, гена *lacZ* – сине-белая селекция на X-gal. Далее с помощью Т4 ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США) осуществлялось лигирование кассеты устойчивости к гигромицину с плазмидой p2NIL с модулем, несущим делецию. Для наработки полученной конструкцией трансформировали компетентные клетки *E. coli* с последующим выделением плазмидной ДНК. Для получения делеционных мутантов осуществляли трансформацию компетентных клеток *M. smegmatis* mc²155, конструкцией с модулем *varBC2* и генами антитоксина *varB2* и токсина *varC2*, несущими делецию. Перед

трансформацией конструкцию подвергали УФ облучению с длиной волны 250 нм в течение 45 сек. Данный этап был необходим для получения одноцепочечных разрывов в молекуле ДНК и активации первого акта рекомбинации. Дальнейший отбор трансформантов *M. smegmatis*, несущих делецию, осуществлялся по методике Parish and Brown (2009).

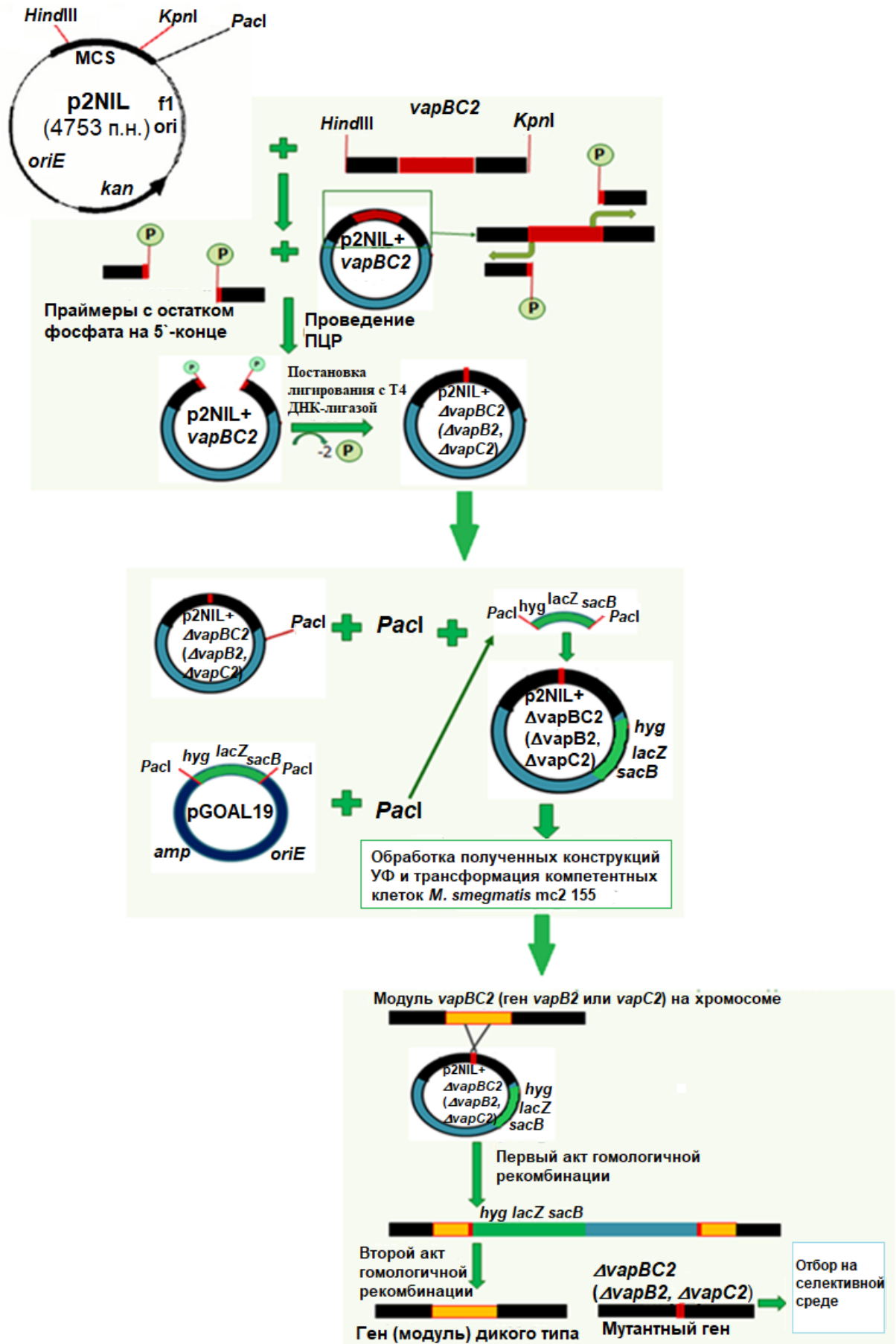


Рисунок 2.2.4.1. Схема получения штаммов *M. smegmatis* с делециями *varBC2*, *varB2* и *varC2*

2.2.5. Выделение и очистка ДНК

Очистку ДНК из реакционной смеси (амплификация, рестрикция, лигирование), а также из 1% агарозного геля проводили с использованием коммерческого набора «Cleanup Mini» (Евроген, Россия) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.2.6. Выделение и очистка плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК из трансформантов *E. coli* осуществляли с использованием коммерческого набора «Plasmid Miniprep kit» (Евроген, Россия) по протоколу фирмы-производителя

2.2.7. Реакция рестрикции

Реакцию рестрикции проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции с укороченным временем реакции Fast Digest (Thermo Scientific, США) – *EcoRV* и *HindIII* (для клонирования генов *varB2* и *varC2*), *NdeI* и *HindIII* (для клонирования *varC46 w.t.* и *varC46 C113G*), *KpnI* и *HindIII* (для клонирования модуля *varBC2*), *BamHI* и *HindIII* (для клонирования генов *varC2* и *varC46* в экспрессионные плазмиды pET28a и pET32a), *NcoI* (для клонирования гена *tig*, кодирующего триггер-фактор *E.coli* в векторную плазмиду pET28a) и *PacI* (для вырезания кассеты маркерных генов из плазмиды pGOAL19) в соответствии с рекомендациями производителя. После проведения реакции рестрикции при необходимости осуществляли термоинактивацию эндонуклеаз рестрикции. Очистку ДНК проводили с использованием набора «Cleanup Mini» (Евроген, Россия) по протоколу фирмы-изготовителя. Для плазмидных векторов использовался метод выделения из 1% агарозного геля.

2.2.8. Реакция лигирования

Реакция лигирования проводилась с использованием T4 ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США). Реакционная смесь имела следующий состав: плазмидный вектор, клонируемый фрагмент, T4 ДНК-лигаза (30 е.а. на 30 мкл смеси), 1× лигазный буфер. Реакцию проводили при температуре 22°C в течение 1 часа. Молярное соотношение вектора и вставки в реакционной смеси составляло 1:5.

2.2.9. Горизонтальный электрофорез ДНК и РНК в агарозном геле

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в 1хТАЕ (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6) в электрическом поле напряжением 6 В/см.

Агарозу растворяли нагреванием (95°C) в 1х ТАЕ буфере в количестве 1 г на 100 мл. буфера, далее охлаждали до 40-50°C и добавляли бромистый этидий (0,4 мкг/мл). Застывший

гель использовали для разделения нуклеиновых кислот. Анализируемые образцы смешивали с красителем Gel Loading Dye, Blue (Евроген, Россия). Фрагменты ДНК и РНК визуализировали в УФ-свете при длине волны 254 нм. Оценку длины исследуемого фрагмента производили с использованием маркеров Gene Ruler λ *Hind*III/*Eco*RI DNA Ladder, GeneRuler 100 b.p. DNA Ladder и GeneRuler 50 b.p. DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.10. Выделение РНК

По достижении необходимой оптической плотности клетки *M. smegmatis* охлаждали во льду в течение 1,5 ч, после чего центрифугировали при +4°C и 4000*g в течение 10 мин. Далее супернатант удаляли, а в клетки добавляли Trizol (Invitrogen, США) и гомогенизировали на максимальной скорости на приборе Speedmill plus (Analytik Jena, Германия) 3 раза по 30 секунд с промежуточным охлаждением во льду. Гомогенизацию осуществляли в пробирках Fastprep Lysing Matrix Beads Tube (MP Bio, США), содержащих стеклянные шарики (диаметр 0,1 мм). Далее образцы инкубировали 5 мин во льду и центрифугировали (1 мин, 12,000*g). После центрифугирования отбирали супернатант в предварительно охлаждённые микроцентрифужные пробирки, добавляли к нему хлороформ/изоамиловый спирт (в соотношении 24/1) и инкубировали в течение 15 мин во льду, периодически перемешивая. Далее центрифугировали при +4°C и 12000*g в течение 15 мин и отбирали верхнюю фазу, к которой добавляли водонасыщенный фенол (рН = 4,5-5), перемешивали и центрифугировали при +4°C и 12000*g в течение 15 мин. Этап с отбором верхней фазы, добавлением водонасыщенного фенола и последующим центрифугированием образцов повторяли до исчезновения интерфазы. После этого отбирали верхнюю фазу, к которой добавляли хлороформ и осаждали. Затем отбирали водную фазу и к ней добавляли 9/10 частей изопропанола и 1/10 часть High Salt Solution (0,8 М цитрат натрия; 1,2 М NaCl). Инкубировали во льду и осаждали центрифугированием 30 мин 12000*g. Далее отмывали 75% этанолом и растворяли в воде.

Качественный анализ выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле, количественный - с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США) и набора Qubit RNA assay BR kit (Invitrogen, США).

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

2.2.11. Проведение реакции обратной транскрипции

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.

2.2.12. Амплификация ДНК в режиме реального времени

Реакцию амплификации в режиме реального времени осуществляли на приборе Bio-Rad CFX96, применяя набор «iTaQ Universal SYBR Green Supermix» (Bio-Rad, США) согласно рекомендациям производителя.

Конечная реакционная смесь содержала: 1 × буфер для ПЦР, содержащий MgCl₂ и dNTPs, hot-start iTaQ полимеразу, SYBR Green I, а также минорные компоненты (усилители, стабилизаторы, флуоресциин, ROX нормализатор), праймеры - по 40 нг на 100 мкл смеси каждого, а также кДНК в количестве 10 нг на 100 мкл смеси.

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

Программа реакции амплификации:

}	40 циклов	95°C – 30''
		95°C – 10''
		65,2°C – 30''
	Градиент температуры плавления	65°C – 95°C - 5''

Амплификацию проводили с использованием праймеров, представленных в Таблице 2.2.2.1.

Для оценки относительного уровня экспрессии модуля ТА использовали экспрессию генов *sigA* и *polA*. Все эксперименты проводили в трех независимых повторах. Вычисление относительного нормализованного уровня экспрессии генов *varC2*, *dosR*, *tetR* осуществляли по методу $\Delta\Delta Cq$ [Haimes and Kelley, 2014].

2.3. Работа с белками

2.3.1. Выделение белков VarC46 и VarC2 из клеточного лизата

Для того, чтобы оценить, из лизата какого штамма *E. coli* и какой клеточной фракции (осадок или надосадочная жидкость), белки VarC46 и VarC2 выделяются в максимальной концентрации, после инкубации с IPTG культуру клеток осаждали центрифугированием при +4°C и 8000*g в течение 10 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в предварительно охлаждённом нативном лизирующем буфере (Таблица 2.3.1.1.) из расчёта 10 объёмов буфера на 1 объём осадка и инкубировали 5-10 минут во льду. Далее осуществляли обработку клеток ультразвуком на приборе Sonics vibra cell (Sonics and materials Inc, США) для разрушения клеточной стенки с использованием следующей программы: 5 циклов: 20 сек – обработка ультразвуком, 15 сек – пауза. После обработки ультразвуком осуществлялось центрифугирование образцов при +4°C и 8000*g в течение 40 минут. Далее полученный лизат разделяли на 2 фракции: надосадочную жидкость и осадок. Оценку наличия белков VarC46 и VarC2 осуществляли с использованием метода вертикального электрофореза в полиакриламидном геле.

Таблица 2.3.1.1. Состав буферов, используемых для выделения белков

Буфер	Состав
Буфер А (для лизиса)	10 mM Tris-HCl pH=8,0; 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, 0,1 mM PMSF
Нативный лизирующий буфер (для VarC46)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10mM имидазол
Лизирующий буфер (для VarC46)	6 М мочевины, 0,1 М NaH ₂ PO ₄ , 0,01 Tris-HCl (pH=8,0)
Промывочный буфер (для VarC46)	6 М мочевины, 0,1 М NaH ₂ PO ₄ , 0,01 Tris-HCl (pH=5,3), 50 mM имидазол
Элюирующий буфер (для VarC46)	6 М мочевины, 0,1 М NaH ₂ PO ₄ , 0,01 Tris-HCl (pH=8,0), 300 mM имидазол
Буфер для 1-й ступени диализа	3 М мочевины, 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 200 mM NaCl, 0,04% меркаптоэтанол

<i>Продолжение Таблицы 2.3.1.1.</i>	
Буфер для 2-й ступени диализа	1,5 М мочевины, 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 200 mM NaCl, 0,04% меркаптоэтанол
Буфер для 3-й ступени диализа	0,5 М мочевины, 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 200 mM NaCl, 0,04% меркаптоэтанол
Лизирующий буфер (для VarC2)	10 mM Tris-HCl pH=8,0; 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, 0,1 mM PMSF
Промывочный буфер (для VarC2)	10 mM Tris-HCl pH=8,0; 300 mM NaCl, 50 mM имидазол, 0,1 mM PMSF
Элюирующий буфер (для VarC2)	10 mM Tris-HCl pH=8,0; 300 mM NaCl, 300 mM имидазол, 0,1 mM PMSF

2.3.2. Выделение белков VarC46 w.t. и VarC46 mut из телец включения

Осадок после обработки ультразвуком и центрифугирования ресуспендировали в 2 мл нативного лизирующего буфера с 0,5% Тритон X-100, после чего центрифугировали при 8000*g, t=+4°C в течение 10 минут. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 3 мл лизирующего буфера до его полного растворения и инкубировали при комнатной t° в течение 30 минут. После инкубации лизат центрифугировали при 8000*g и t=+4°C в течение 10 минут и супернатант наносили на колонки с Ni-NTA (QIAGEN, Германия), после чего центрифугировали при 270*g и t=+4°C в течение 2 минут. Далее на колонки с Ni-NTA наносили 600 мкл нативного лизирующего буфера, центрифугировали при 270*g и t=+4°C в течение 5 минут. После центрифугирования удаляли раствор, прошедший через колонку. Затем добавляли 600 мкл лизирующего буфера, центрифугировали при 270*g и t=+4°C в течение 2 минут. Раствор, прошедший через колонку, удаляли, предварительно отобрав пробу для нанесения на гель для последующего анализа. Далее добавляли в колонку 600 мкл промывочного буфера и центрифугировали при 890*g и t=+4°C в течение 2 минут. Как и на предыдущем этапе, раствор, прошедший через колонку, удаляли, предварительно отобрав пробу для нанесения на гель для последующего анализа. Промывку колонки с Ni-NTA с последующим центрифугированием и удалением лизата проводили 3 раза. Далее осуществляли элюирование образцов путём добавления 200 мкл элюирующего буфера и последующего центрифугирования при 890*g и t=+4°C в течение 2 минут и отбора проб для постановки электрофореза. Для

повышения итоговой концентрации выделенных белков в лизате данный этап повторяли 2 раза. Затем проводили диализ с использованием Slide-A-Lyzer Dialysis Device (Thermo Fisher Scientific, США), в который добавляли лизат после двух этапов элюции. Первую ступень диализа проводили в буфере с 3 М мочевиной в течение 16 ч, вторую ступень – в буфере с 1,5 М мочевиной в течение 3 ч, третью – в буфере с 0,5 М мочевиной в течение 2 ч. На протяжении всех ступеней диализа инкубация осуществлялась при $t=+4^{\circ}\text{C}$ и 200 rpm. Состав буферов для выделения белков представлен в Таблице 2.3.1.1.

2.3.3. Выделение белка VarC2 из растворимой фракции

Супернатант, отобранный после обработки ультразвуком и последующего центрифугирования, нанесли на уравновешенную колонку с Ni-NTA (QIAGEN, Германия) и центрифугировали при 270^*g и $t=+4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут. Раствор, прошедший через колонку, удаляли, предварительно отобрав пробу для нанесения на гель для последующего анализа. Далее добавляли 600 мкл промывочного буфера и центрифугировали при 890^*g и $t=+4^{\circ}\text{C}$ в течение 2 минут. Как и на предыдущем этапе, раствор, прошедший через колонку, удаляли, предварительно отобрав пробу для нанесения на гель для последующего анализа. Промывку колонки с Ni-NTA с последующим центрифугированием и удалением лизата проводили 2 раза. Затем дважды осуществляли элюирование образцов путём добавления 200 мкл элюирующего буфера и последующего центрифугирования при 890^*g и $t=+4^{\circ}\text{C}$ в течение 2 минут и отбора проб для постановки электрофореза. Состав буферов для выделения белка представлен в Таблице 2.3.1.1. Выделение белков *tig-VarC46 w.t.* и *tig-VarC46 mut* из растворимой фракции лизата осуществлялось так же, как и выделение белка VarC2.

2.3.4. Постановка вертикального электрофореза в полиакриламидном геле

Сначала осуществляли заливку разделяющего геля, затем после его полимеризации, заливали концентрирующий гель. Состав гелей для белкового электрофореза приведён в Таблице 2.3.4.1. Для нанесения на гель к образцам, выделенным из надосадочной жидкости, добавляли равный объём Sample-буфера (Таблица 2.3.4.1.), ресуспендировали, инкубировали 3 мин при $+85^{\circ}\text{C}$ и наносили на гель.

Таблица 2.3.4.1. Состав гелей для вертикального электрофореза

Гель	Состав
Разделяющий	На 20 мл геля: Раствор А – 5 мл, Раствор В – 8,3 мл, глицерин – 1 мл, вода – 5,7 мл, PSA – 10 мкл, TEMED – 35 мкл.
Концентрирующий	На 6 мл геля: Раствор А` - 1,5 мл, Раствор В – 1 мл, вода – 3,5 мл, PSA – 80 мкл, TEMED – 15 мкл.

К образцам, выделенным из осадка, добавляли Sample-буфер из расчёта: 200 мкл буфера на 10 мг осадка, после чего инкубировали 10 мин при 85°C, далее осаждали при комнатной t°, 10000*g в течение 3 мин и наносили на гель. В качестве маркера длины использовали Protein marker, broad range 2-212 кДа (New England Biolabs, Великобритания). Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза (Biorad, США) при силе тока из расчёта 15мА на стекло, напряжение 85 В в течение 3 ч.

Далее гель переносили в раствор для фиксации и инкубировали при комнатной t° в течение 30 минут, после чего переносили в предварительно нагретый раствор для окрашивания и инкубировали при t=90°C в течение 3 минут. После окрашивания осуществляли отмывку геля в 7% уксусной кислоте при t=60°C в течение 40 минут.

Таблица 2.3.4.2. Состав растворов, используемых для постановки электрофореза в полиакриламидном геле

Раствор	Состав
Раствор А (pH=8,8)	1,5 М Trisma base, 0,1% SDS. pH довести путём добавления HCl
Раствор А` (pH=6,8)	0,5 М Trisma base, 0,1% SDS. pH довести путём добавления HCl
Раствор В	29,2% акриламид, 0,8% метилен-бисакриламид
Электродный буфер (pH=8,3-8,4)	0,025 М Trisma base, 0,192 М глицин, 0,1% SDS
Раствор для фиксации	На 300 мл раствора: 150 мл этанола, 40 мл ледяной уксусной кислоты, 110 мл воды

Продолжение Таблицы 2.3.4.2	
Раствор для окрашивания	На 300 мл раствора: 0,4 г. Кумасси G-250, 80 мл этанола, 40 мл ледяной уксусной кислоты, 180 мл воды
Раствор для отмывки геля	7% уксусная кислота
Sample буфер	200 mM Tris-HCl pH=6,8; 4% SDS; 0,01% бромфеноловый синий, 40% глицерин 400 mM β -меркаптоэтанол

2.3.5. Исследование рибонуклеазной активности

Исследование рибонуклеазной (РНКазной) активности проведено по методике, описанной в статье Ramage et al., 2009 с некоторыми модификациями. Для определения РНКазной активности 10 мкг белка-токсина добавляли к 10 мкг РНК бактериофага MS2 (Roche Applied Science). Количество белка-токсина и РНК MS2 было увеличено для лучшей детекции РНКазной активности на фореze. В связи с полным разрушением РНК MS2 при 3 ч инкубации при +37°C, время инкубации реакционной смеси было сокращено до 2 ч. Для реакционной смеси использовали буфер для определения РНКазной активности (Таблица 2.3.5.1.).

Таблица 2.3.5.1. Состав буферов для определения РНКазной и шаперонной активности токсинов

Буферы	Состав
Буфер для определения РНКазной активности	10 mM Tris (pH=7,0), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl
Буфер для рефолдинга	25 mM HEPES (pH=7,5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM дитиотреитол, 1 mM АТФ

В качестве отрицательного контроля была использована РНК MS2 (10 мкг) в реакционном буфере. В качестве положительного контроля была использована MS2 (10 мкг) с добавлением 10 мкг РНКазы А. Кроме того, в качестве положительного контроля и для сравнительного анализа РНКазной активности белка токсина VarC2 использовали выделенный параллельно с VarC2 токсин из *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 VarC (плазмидный вектор с *varC* *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 любезно предоставлен Алексеевой М. Г.), который обладает РНКазной активностью [Averina et al., 2015]. По окончании инкубации образцы подвергали

электрофорезу в 1% агарозном геле при 5 В/см в течение 1 часа. Индикация образцов произведена в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на трансиллюминаторе TCP-20 MC (Vilber Lourmat, Германия) с использованием гель-документирующей системы Mega Bio-Print 3020-WL/LC/20M X-Press (Vilber Lourmat, Германия).

2.3.6. Исследование шаперонной активности белка VarC2 с использованием β -галактозидазы

Оценка шаперонной активности белка VarC2 и возможности его участия в регуляции шаперонной активности DnaK проводилась по методу Такаюама (1997) с некоторыми модификациями [Такаюама et al., 1997]. Для более точной оценки коэффициента шаперонной активности первоначально необходимо построение калибровочной кривой. Для этого был приготовлен буфер для рефолдинга (Таблица 2.3.5.1.), к которому добавляли β -галактозидазу (ООО «АТЛ») в различных концентрациях (0,25 мкг/мл, 0,125 мкг/мл, 0,0625 мкг/мл, 0,0312 мкг/мл, 0,0156 мкг/мл и 0 мкг/мл).

Затем к 50 мкл реакционной смеси каждого образца добавляли 1 мкл раствора ОНФГ в диметилформамиде и инкубировали в течение 15 мин при 37°C, после чего добавляли 12,5 мкл 1 М Na₂CO₃ для прекращения реакции. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 412 нм.

На первом этапе работы была построена калибровочная кривая, с использованием которой было определено оптимальное количество β -галактозидазы, которое необходимо взять для проведения реакции рефолдинга (Рисунок 2.3.6.1.). С использованием калибровочной кривой было установлено количество β -галактозидазы для проведения реакции рефолдинга, которое составило 0,025 мкг.



Рисунок 2.3.6.1. Калибровочная кривая для β-галактозидазы

Для оценки шаперонной активности токсина VarC2 β-галактозидазу денатурировали в 6 М гуанидин-гидрохлориде в течение 30 минут при 30°C. Реакция рефолдинга денатурированной β-галактозидазы в концентрации 0,25 мкг/мкл проводилась при 37°C в буфере для рефолдинга, содержащем белок VarC2, DnaK и контрольные образцы. Измерение активности β-галактозидазы осуществлялось через 60 минут после инкубации. Затем к реакционной смеси добавляли к 1μл ONPG (орто-нитрофенил-βD-галактопиранозид) и инкубировали при 37°C в течение 15 минут для остановки реакции. Далее добавляли 12,5 μл 1 М Na₂CO₃. Уровень поглощения каждого образца измеряли при длине волны 412 нм.

Активность β-галактозидазы была подсчитана по формуле:

$$\frac{OD_{412} * V_{\text{конечной смеси, мкл}}}{\text{коэффициент для ОНФГ} * t \text{ (мин)} * V_{\text{калибровочного раствора}}}$$

Процент активности β-галактозидазы после рефолдинга подсчитан по формуле:

$$\frac{\text{активность } \beta\text{-галактозидазы после рефолдинга}}{\text{активность нативной } \beta\text{-галактозидазы}} * 100\%$$

При оценке шаперонной и кошаперонной активности были использованы (Таблица 2.3.6.1.): реакционная смесь, содержащая денатурированную β-галактозидазу без добавления шаперонов (отрицательный контроль), реакционная смесь, содержащая денатурированную β-галактозидазу с добавлением шаперонного белка микобактерий DnaK, реакционная смесь,

содержащая денатурированную β -галактозидазу с добавлением VarC2, реакционная смесь, содержащая денатурированную β -галактозидазу с добавлением DnaK и VarC2 и реакционная смесь, содержащая неденатурированную β -галактозидазу.

Таблица 2.3.6.1. Образцы, использованные при оценке шаперонной активности белка VarC2 в присутствии β -галактозидазы

№ образца	Описание
1 (отрицательный контроль)	денатурированная β -галактозидаза
2	денатурированная β -галактозидаза + DnaK
3	денатурированная β -галактозидаза + VarC2
4	денатурированная β -галактозидаза +DnaK+VarC2
5	неденатурированная β -галактозидаза

2.3.7. Исследование шаперонной активности белка VarC2 с использованием люциферазы светлячка *Photinus pyralis*

Было проведено исследование шаперонной и кошаперонной активности VarC2 с использованием люциферазы *Photinus pyralis* (Promega, США) с субстратом люциферинном [Baldwin et al., 1993]. Данный субстрат был использован в исследовании, т.к. в отличие от бактериальной, люцифераза светлячка является односубъединичным белком и её активность может быть достоверно определена с помощью фотометрического анализа [Shroder et al., 1993; Genest et al., 2011]. 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. Молекулярные массы белков составляют:

люцифераза – 62 кДа, DnaK – 69 кДа, VarC2 – 16,8 кДа. Пересчёт в молярные концентрации белков, используемых в анализе, осуществлён по формуле с интернет-ресурса molbiol.ru (http://molbiol.ru/scripts/01_04.html) с использованием величины молекулярной массы (Таблица 2.3.7.1.).

Таблица 2.3.7.1. Молекулярные массы белков

Белок	Молекулярная масса (кДа)
люцифераза	62
DnaK	69
VarC2	16,8

Измерение люминесценции осуществлялось через 60 минут после инкубации. Процент активности люциферазы после рефолдинга подсчитан по формуле:

$$\frac{\text{активность люциферазы после рефолдинга}}{\text{активность нативной люциферазы}} * 100\%$$

При оценке шаперонной и кошаперонной активности использованы следующие образцы (Таблица 2.3.7.2.): реакционная смесь, содержащая денатурированную люциферазу (отрицательный контроль), реакционная смесь, содержащая денатурированную люциферазу с добавлением шаперонного белка DnaK, реакционная смесь, содержащая денатурированную люциферазу с добавлением VarC2, реакционная смесь, содержащая денатурированную люциферазу с добавлением DnaK и VarC2, и реакционная смесь, содержащая неденатурированную люциферазу.

Таблица 2.3.7.2. Образцы, использованные при оценке шаперонной активности белка VarC2 в присутствии люциферазы *Photinus pyralis*

№ образца	Описание
1 (отрицательный контроль)	денатурированная люцифераза
2	денатурированная люцифераза + DnaK
3	денатурированная люцифераза + VarC2
4	денатурированная люцифераза+ DnaK + VarC2

Продолжение Таблицы 2.3.7.2	
5	неденатурированная люцифераза

2.4. Биоинформатический анализ

Биоинформатический анализ модулей *varBC46 M. tuberculosis* и *varBC2 M. smegmatis* проводился с использованием следующих программ и баз данных:

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – для поиска гомологов генов модуля *varBC46* в геноме *M. smegmatis*;

UniProt (<https://www.uniprot.org>) – при анализе доменной структуры компонентов системы ТА *VarBC2 M. smegmatis*;

STRING database (<https://string-db.org>) – для анализа предполагаемых взаимодействий компонентов модулей *varBC46* и *varBC2* с другими белками *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*, соответственно;

PredictSNP (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) [Bendl et al., 2014] – для оценки влияния мутации C₁₁₃G в гене *varC46* на функцию кодируемого им токсина VarC46. При оценке влияния мутации C₁₁₃G *varC46* на физико-химические свойства токсина использовали один из инструментов PredictSNP - MAPP (Multivariate Analysis of Protein Polymorphism, или Многомерный анализ полиморфизмов белков) [Stone et al., 2005] Коэффициент достоверности полученных данных составил 78%;

trRosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) [Du et al., 2021; Wang et al., 2022; Su et al., 2021] – для построения структурных моделей белка токсина VarC46 его мутантного варианта.

2.5. 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 выявленных различий использовали метод ANOVA [Anders, 2017].

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Исследование стресс-адаптивных функций модуля *varBC46 M. tuberculosis*

3.1.1. 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 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp1/>) [Bendl et al., 2014]. 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.

3.1.2. 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 3.1.2.1.).

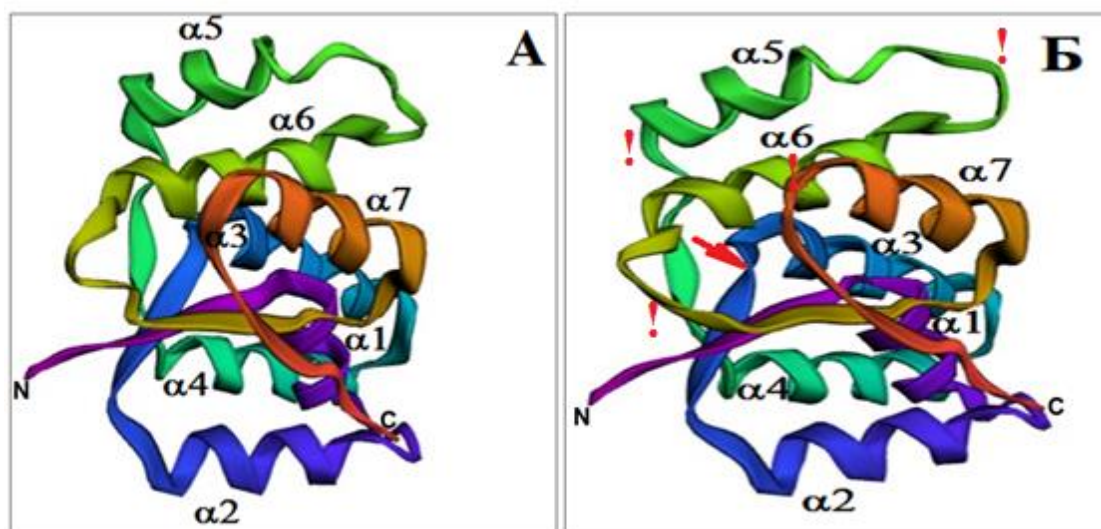


Рисунок 3.1.2.1. Структурные модели белка VarC46, полученные с использованием программы trRosetta: А- VarC46 w.t., Б – VarC46 mut. Цветом обозначены: фиолетовый – N-конец белка, красный – С-конец. Стрелкой обозначен участок, в котором, предположительно, локализована мутация. (!) – обозначены участки с наиболее выраженными изменениями.

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

3.1.3. 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* (Рисунок 2.2.1.3. Б) 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 3.1.3.1). Таким образом, мутация в гене *varC46* восстанавливает нормальную скорость роста.

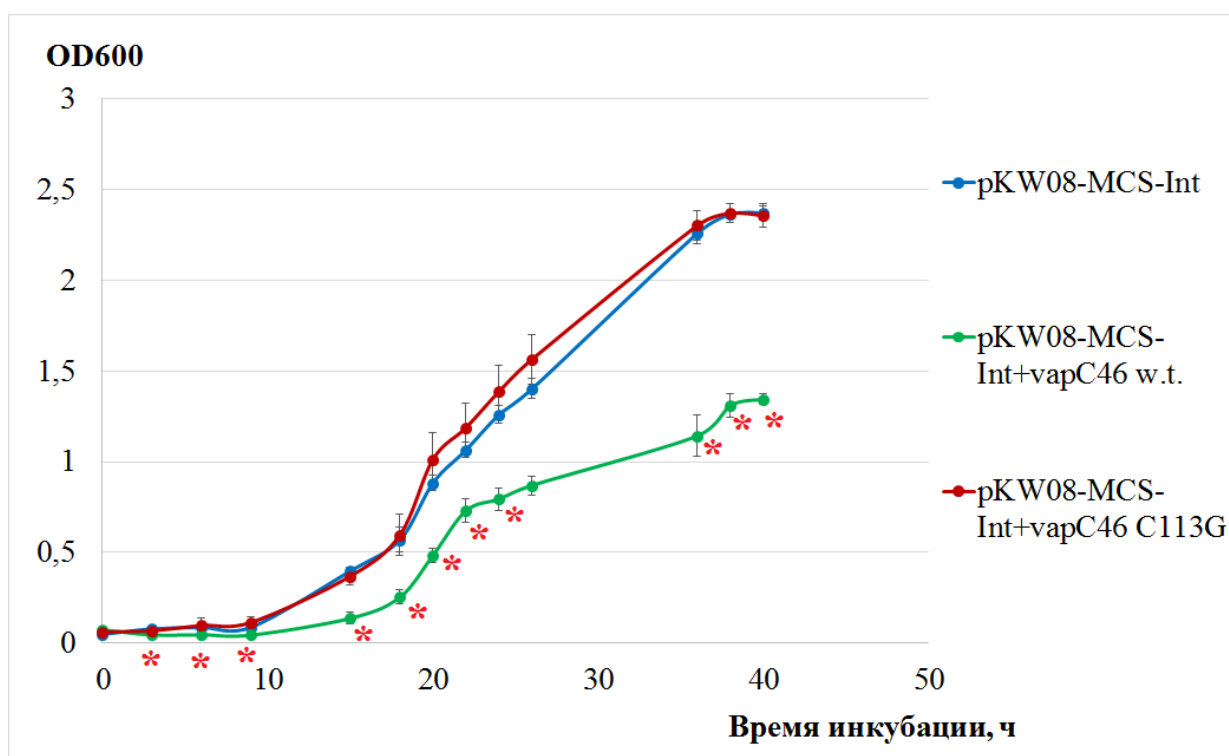


Рисунок 3.1.3.1 Кривая роста культуры трансформантов *M. smegmatis*, содержащих векторную плазмиду без вставки (pKW08-MCS-Int), со вставкой гена *vapC46* w.t. (pKW08-MCS-Int+*vapC46*) и *vapC46* C₁₁₃G (pKW08-MCS-Int+*vapC46* C₁₁₃G). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

3.1.4. Оценка влияния гена *vapC46* дикого типа и его мутантного варианта на лекарственную чувствительность *M. smegmatis*

Было осуществлено определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) 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 *vapC46* (Рисунок 3.1.4.1.). При этом однонуклеотидная замена в гене *vapC46* не влияла МИК эритромицина относительно дикого типа. Таким образом, экспрессия обоих вариантов гена *vapC46* приводит к повышению устойчивости *M. smegmatis* к эритромицину.

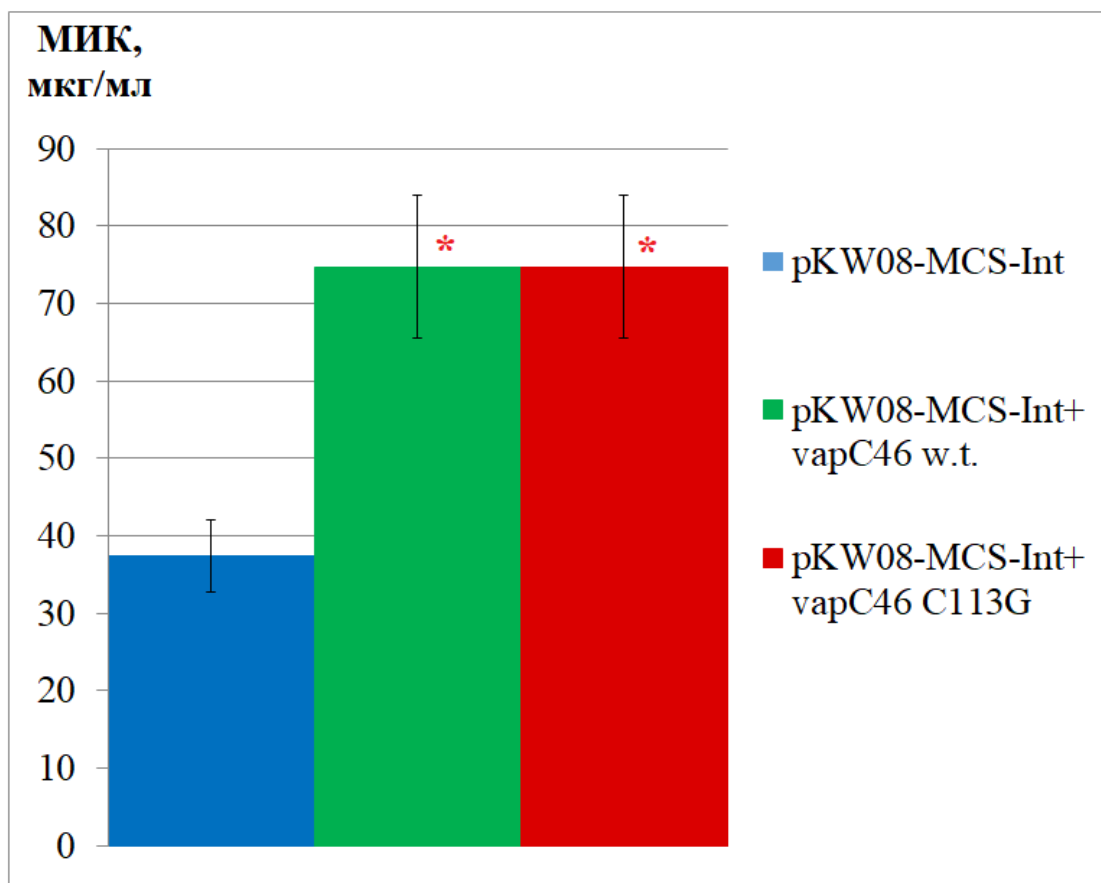


Рисунок 3.1.4.1. Величина МИК эритромицина для трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G после 72 ч инкубации. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Вместе с тем, обнаружено увеличение МИК офлоксацина в 2 раза для трансформантов *M. smegmatis*, несущих ген *vapC46* дикого типа (Рисунок 3.1.4.2). Напротив, вставка мутантного варианта *vapC46* не приводила к изменению МИК относительно контроля. Таким образом, токсин, кодируемый геном *vapC46*, вероятно, может участвовать в регуляции устойчивости к офлоксацину, а мутация C₁₁₃G приводит к утрате данной функции.

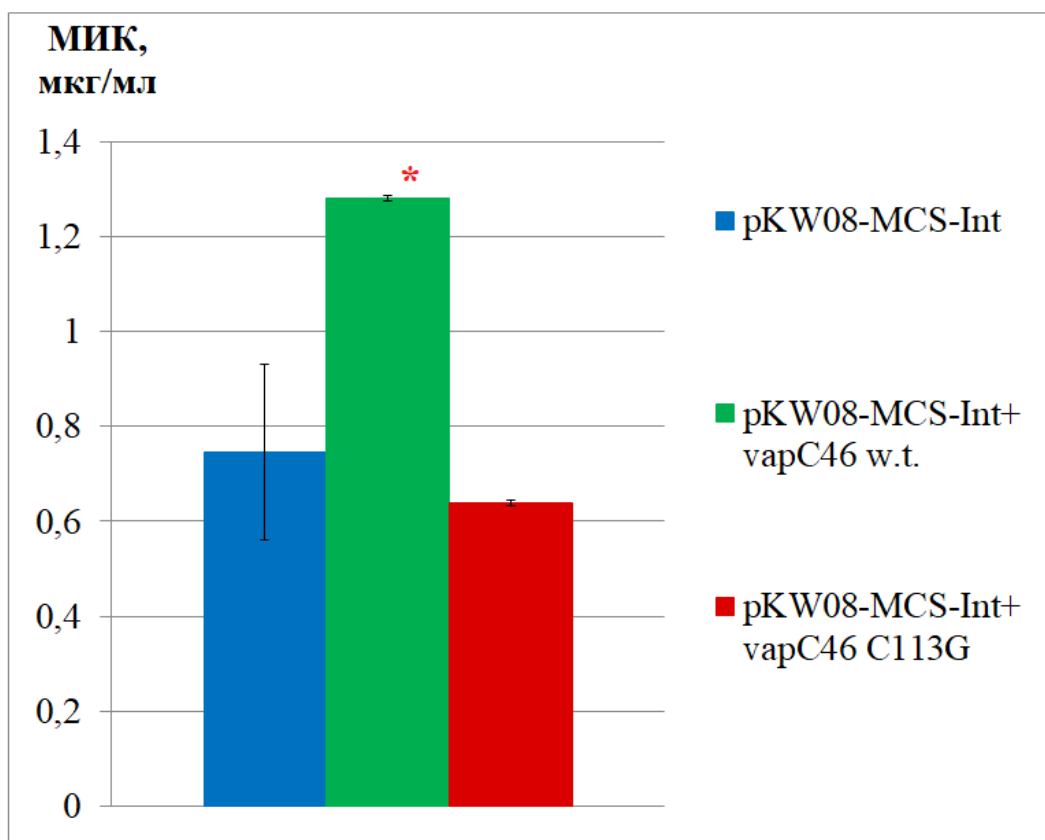


Рисунок 3.1.4.2. Величина МИК офлоксацина для трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS Int, pKW08-MCS Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS Int + *vapC46* C₁₁₃G после 72 ч инкубации. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Анализ МИК рифампицина показал отсутствие изменений в уровне устойчивости при экспрессии как исходного, так и мутантного варианта гена *vapC46* (Рисунок 3.1.4.3.).

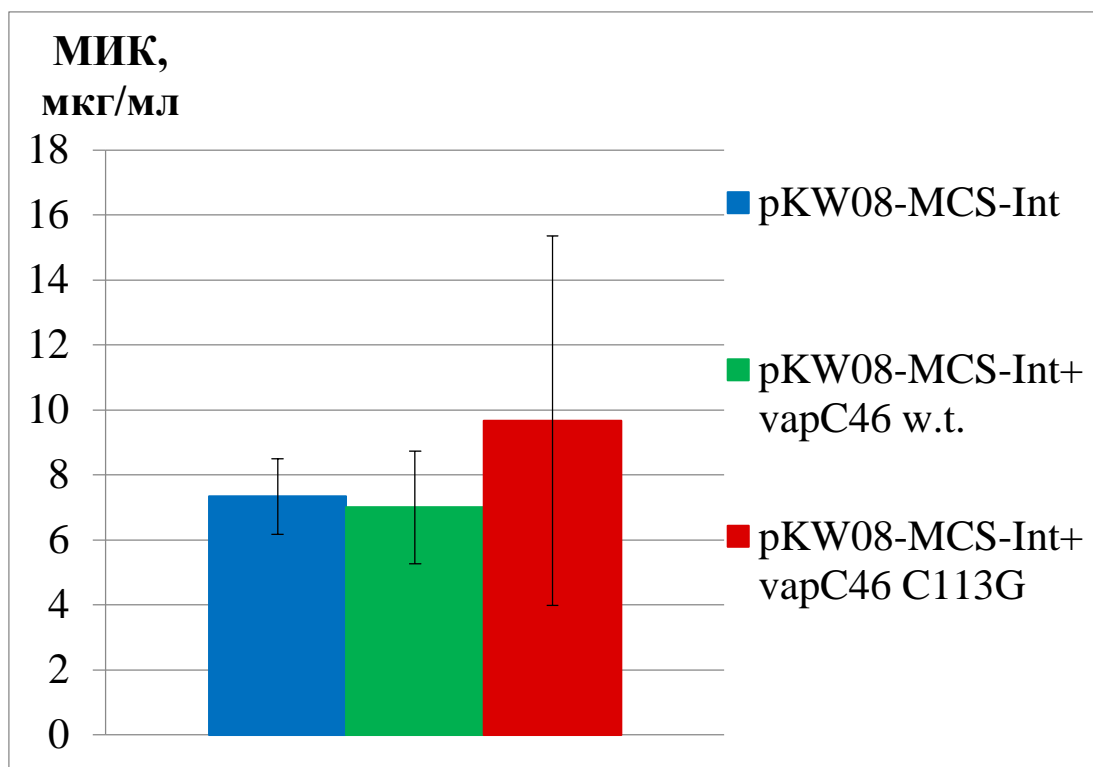


Рисунок 3.1.4.3. Величина МИК рифампицина для трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS Int, pKW08-MCS Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS Int + *vapC46* C₁₁₃G после 72 ч инкубации. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

3.1.5. Исследование влияния *vapC46* на рост и выживаемость трансформантов *M. smegmatis* в условиях окислительного стресса

При исследовании оптической плотности культуры трансформантов *M. smegmatis*, не содержащих ген токсина *vapC46*, а также трансформантов с обоими вариантами гена *vapC46* при инкубации в присутствии 0,5 mM H₂O₂ не было обнаружено выраженных изменений в величине оптической плотности при кратковременном (до 1 ч.) воздействии окислительного стресса (Рисунок 3.1.5.1.). Более длительная инкубация (2 ч) в присутствии 0,5 mM H₂O₂ приводит к выраженному в равной степени снижению оптической плотности у всех трансформантов *M. smegmatis* (pKW08-MCS Int, pKW08+*vapC46* w.t., pKW08+*vapC46* C₁₁₃G).

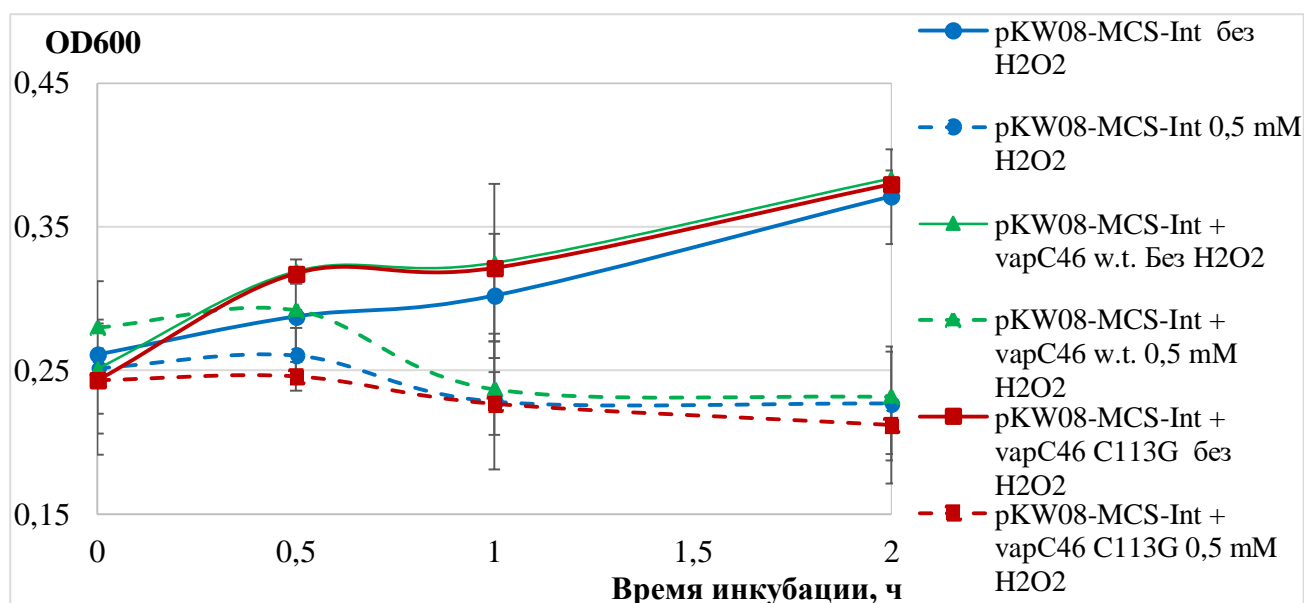


Рисунок 3.1.5.1. Динамика изменения оптической плотности (OD_{600}) культуры трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G в нормальных условиях роста и при воздействии 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

Также было обнаружено, что вставка исходного и мутантного вариантов гена *vapC46* не приводит к изменению оптической плотности культуры относительно контроля, как при нормальных условиях роста, так и при воздействии 0,5 mM H₂O₂.

В результате подсчёта числа КОЕ было обнаружено увеличение КОЕ при кратковременном (до 0,5 ч) воздействии 0,5 mM H₂O₂ у трансформантов *M. smegmatis* со вставкой как исходного, так и мутантного варианта гена *vapC46* по сравнению с контрольным штаммом (Рисунки 3.1.5.2-3.1.5.6). При этом наблюдается резкое уменьшение числа КОЕ в течение первого часа инкубации в присутствии H₂O₂ как у контрольного штамма *M. smegmatis*, так и у трансформантов с обоими вариантами гена *vapC46*. Однако даже после 2 ч инкубации в присутствии 0,5 mM H₂O₂ все три группы трансформантов *M. smegmatis* в равной степени образовывали КОЕ. Это может указывать на то, что длительное воздействие (2ч) 0,5 mM H₂O₂ не приводит к полной гибели культуры, т.к. сохраняется незначительная часть клеток, способная формировать колонии.

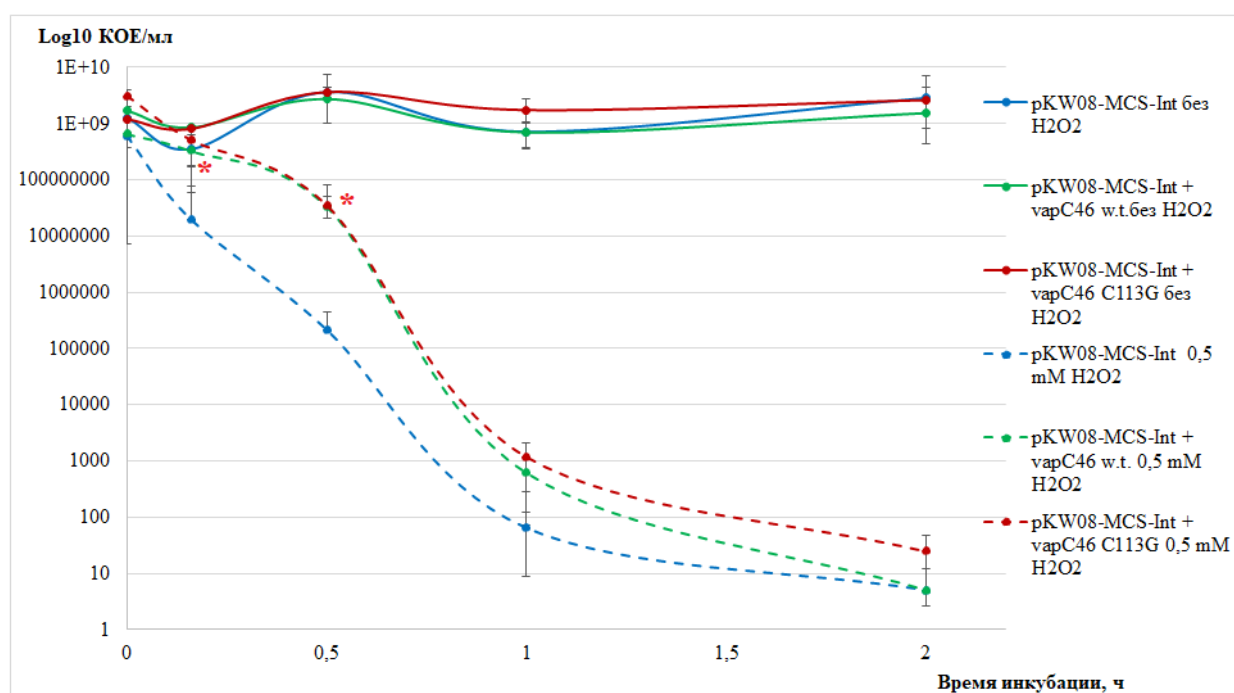


Рисунок 3.1.5.2. Динамика изменения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) культуры трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G в нормальных условиях роста и при воздействии 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

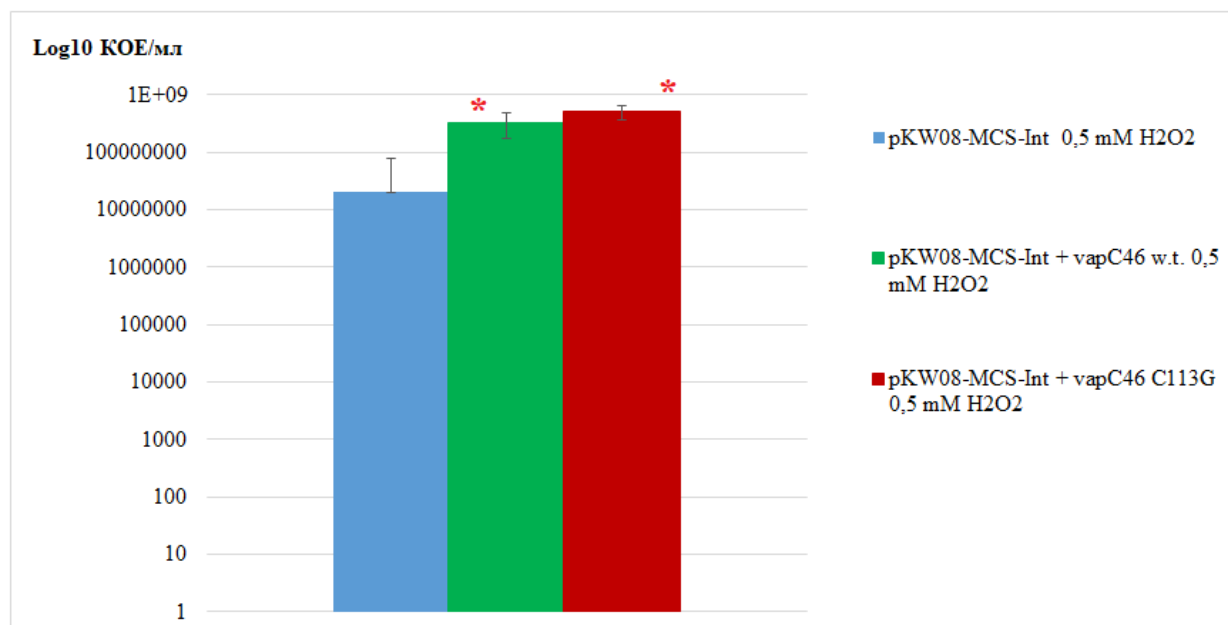


Рисунок 3.1.5.3. Сравнение числа КОЕ трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 10 мин воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

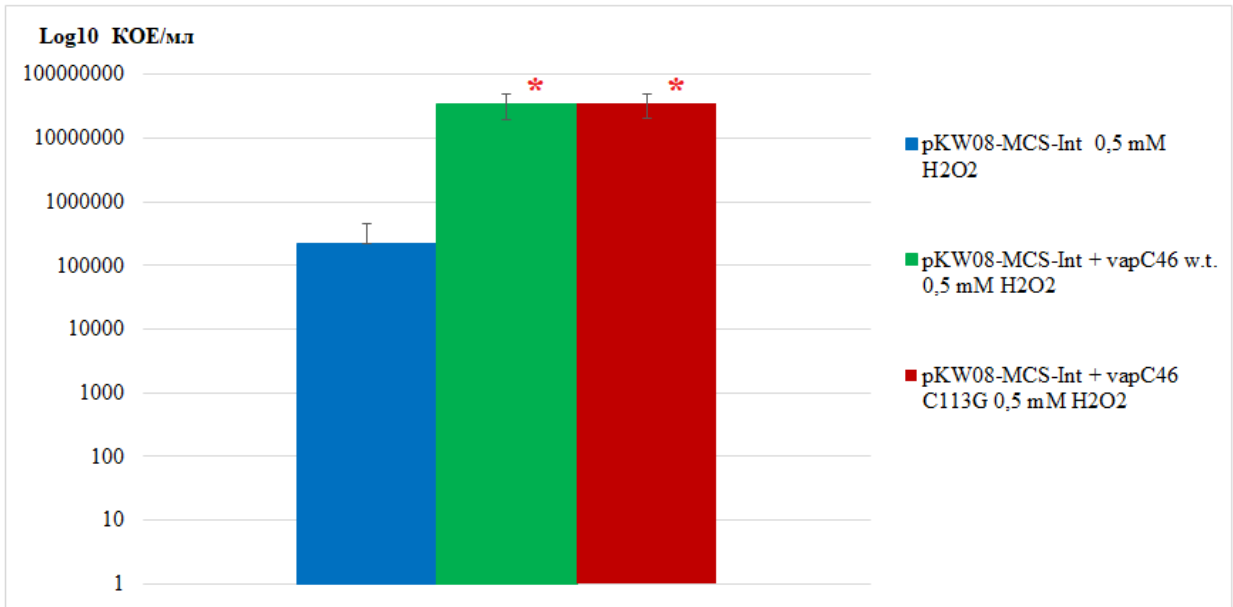


Рисунок 3.1.5.4. Сравнение числа КОЕ трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 0,5 ч воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

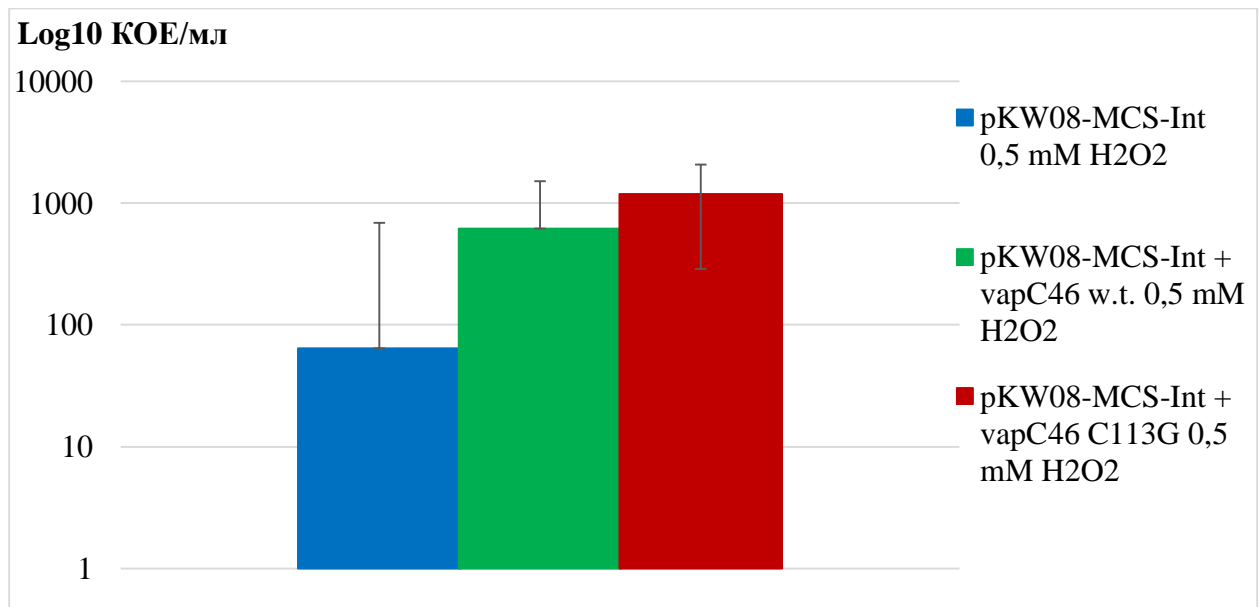


Рисунок 3.1.5.5. Сравнение числа КОЕ трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 1 ч воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

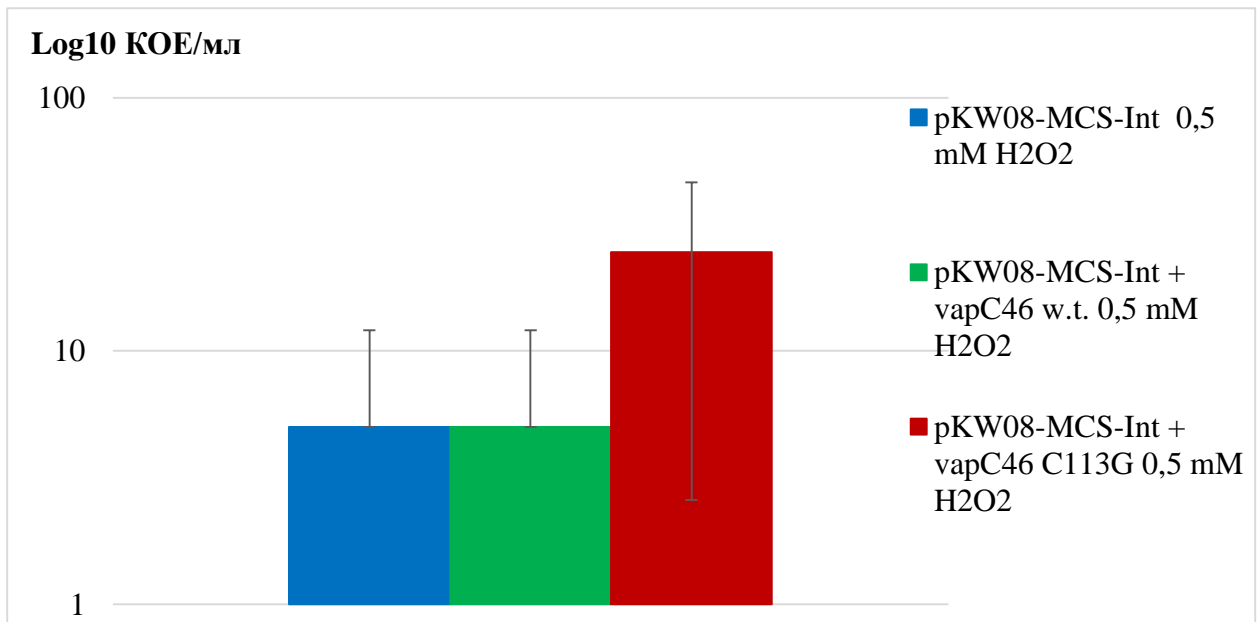


Рисунок 3.1.5.6. Сравнение числа КОЕ трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 2 ч воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

Для более точной оценки влияния вставки гена токсина на устойчивость *M. smegmatis* к окислительному стрессу дополнительно было проведено определение выживаемости клеток *M. smegmatis*. Данная величина характеризует отношение числа КОЕ, полученных при инкубации в присутствии 0,5 mM H₂O₂ к числу КОЕ, полученных при инкубации в нормальных условиях роста в течение одного и того же временного интервала.

Оценка выживаемости трансформантов *M. smegmatis* в условиях воздействия окислительного стресса показала ее резкое снижение в течение 1 ч инкубации в присутствии 0,5 mM H₂O₂ как у трансформантов *M. smegmatis*, не содержащих ген *vapC46*, так и у клеток *M. smegmatis*, несущих *vapC46* дикого типа или его мутантный вариант (Рисунок 3.1.5.7.).

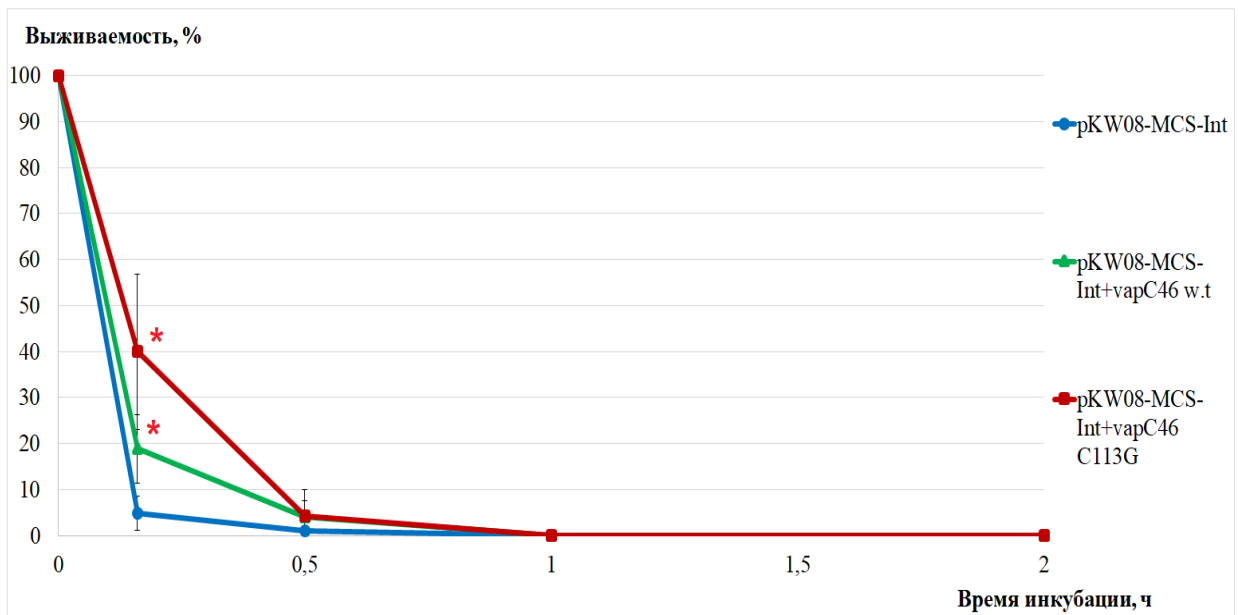


Рисунок 3.1.5.7. Динамика выживаемости трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G в условиях воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

При кратковременном воздействии 0,5 mM H₂O₂ (до 0,5 ч) обнаружено повышение выживаемости трансформантов *M. smegmatis*, несущих оба варианта гена *vapC46*, по сравнению с контрольным штаммом (Рисунки 3.1.5.8.- 3.1.5.9.).

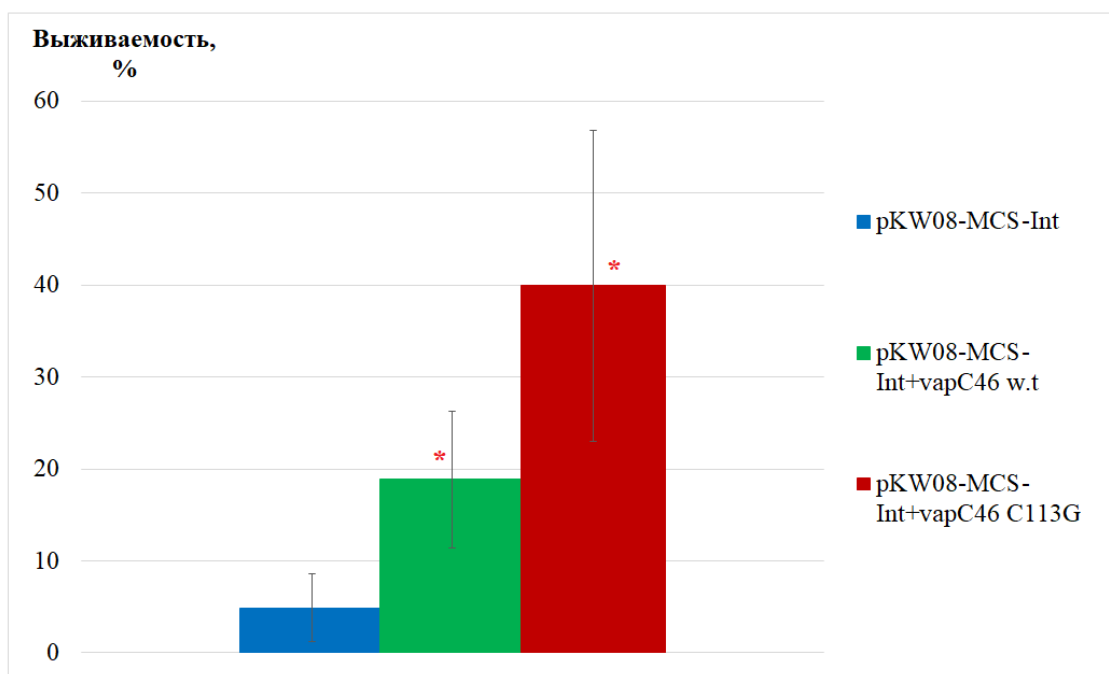


Рисунок 3.1.5.8. Сравнение выживаемости трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 10 мин воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

При этом различия в выживаемости трансформантов *M. smegmatis*, несущих разные варианты гена *vapC46*, отсутствуют.

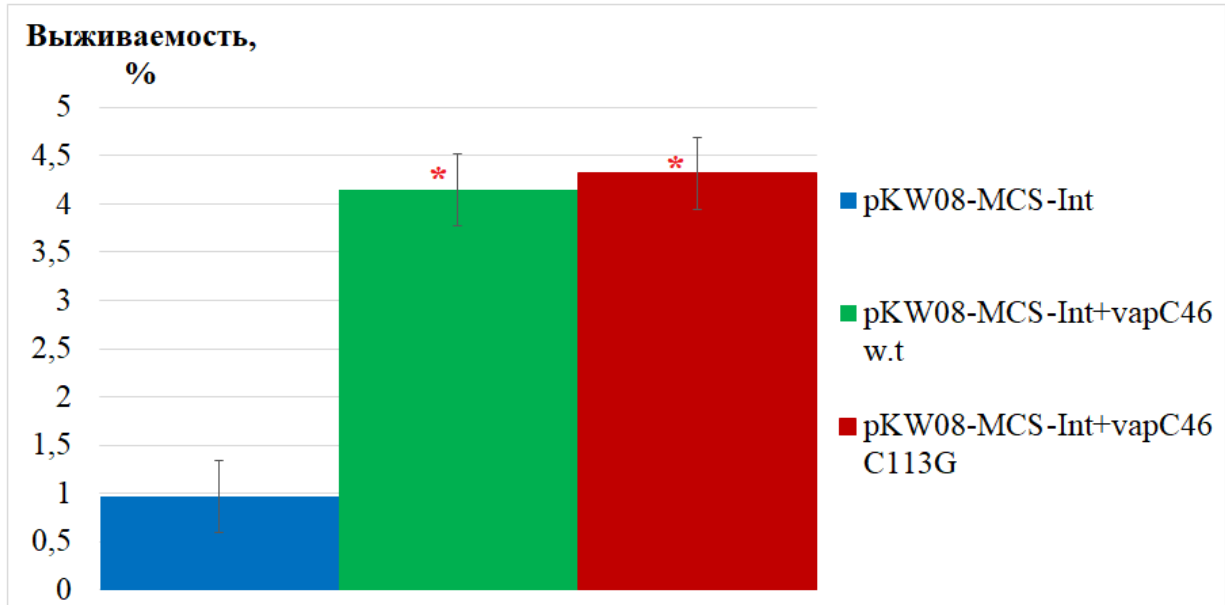


Рисунок 3.1.5.9. Сравнение выживаемости трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 0,5 ч воздействии 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

При дальнейшей инкубации в присутствии 0,5 mM H₂O₂ различия в степени выживаемости между трансформантами *M. smegmatis* нивелируются (Рисунки 3.1.5.10-3.1.5.11).

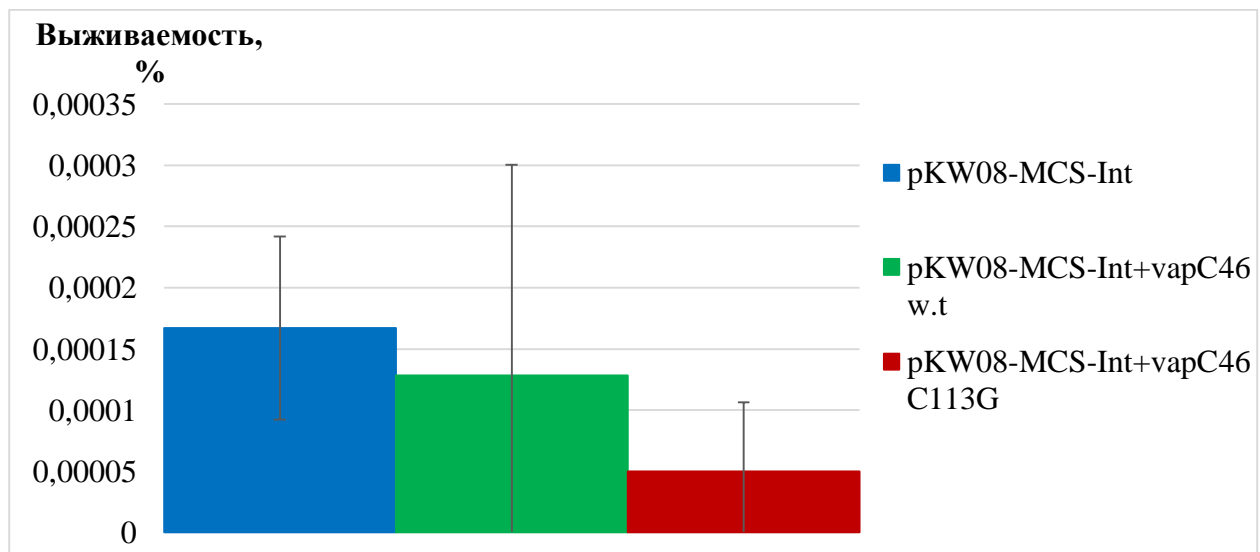


Рисунок 3.1.5.10. Сравнение выживаемости трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C₁₁₃G при 1 ч воздействии 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

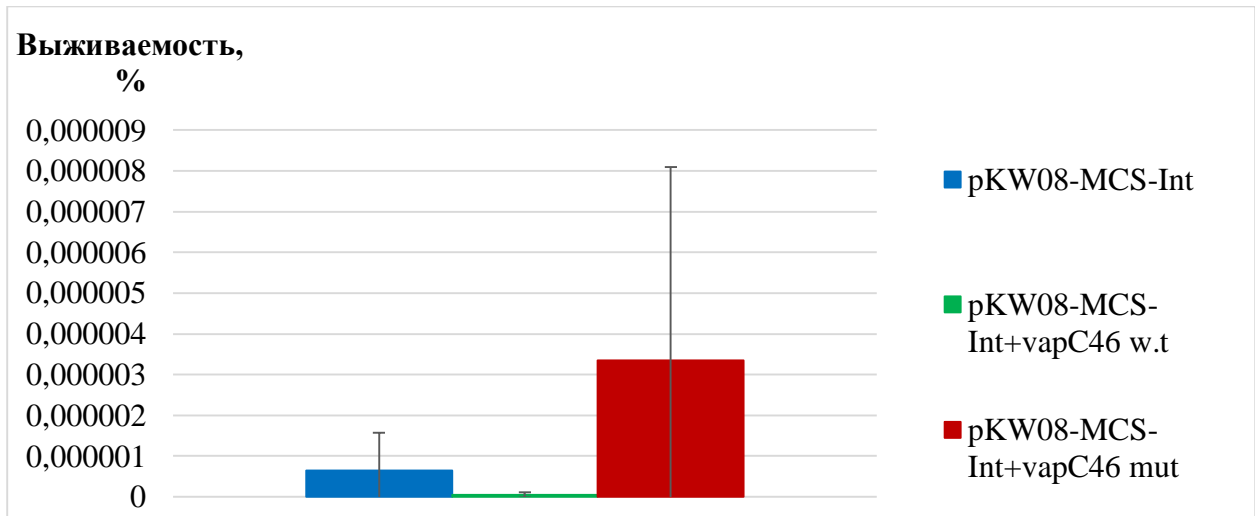


Рисунок 3.1.5.11. Сравнение выживаемости трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *varC46* w.t., pKW08-MCS Int + *varC46* C₁₁₃G при 2 ч воздействии 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

На основании полученных данных можно предположить, что токсин VarC46 может участвовать в адаптации бактериальных клеток к окислительному стрессу, связанному с кратковременным воздействием H₂O₂. При этом мутация в гене *varC46* не оказывает влияния на данную функцию токсина.

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

Было показано, что ни вставка *varC46* дикого типа, ни его мутантного варианта в условиях лимитирования соединений азота и углерода не приводит к изменению оптической плотности культуры относительно контроля на протяжении всего периода инкубации (Рисунок 3.1.6.1.). При этом было обнаружено замедление скорости роста в минимальной среде (с достаточным содержанием источников азота и углерода) у трансформантов *M. smegmatis* со вставкой гена *varC46* дикого типа (Рисунок 3.1.6.1. А)

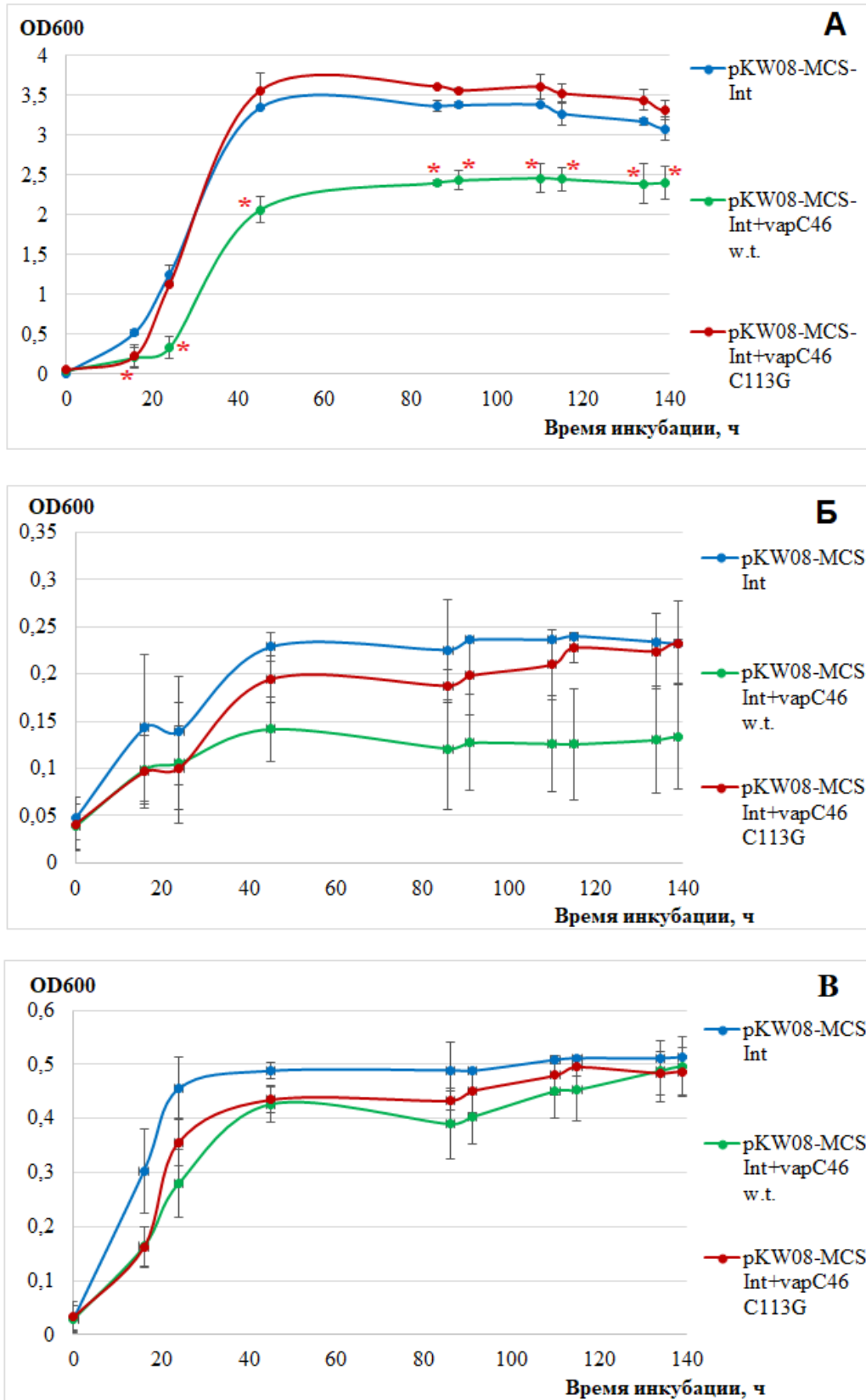


Рисунок 3.1.6.1. Динамика изменения оптической плотности (OD_{600}) культуры трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *vapC46* C113G при инкубации в минимальной среде (А), в минимальной среде без азота (Б) и минимальной среде без углерода (В). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх

независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Подсчёт числа колониобразующих единиц показал отсутствие статистически достоверных различий между трансформантами *M. smegmatis*, несущими исходный или мутантный вариант гена *varC46*, и контрольным штаммом на протяжении всего периода инкубации в минимальных средах, не содержащих азот или углерод (Рисунок 3.1.6.2. Б и В).

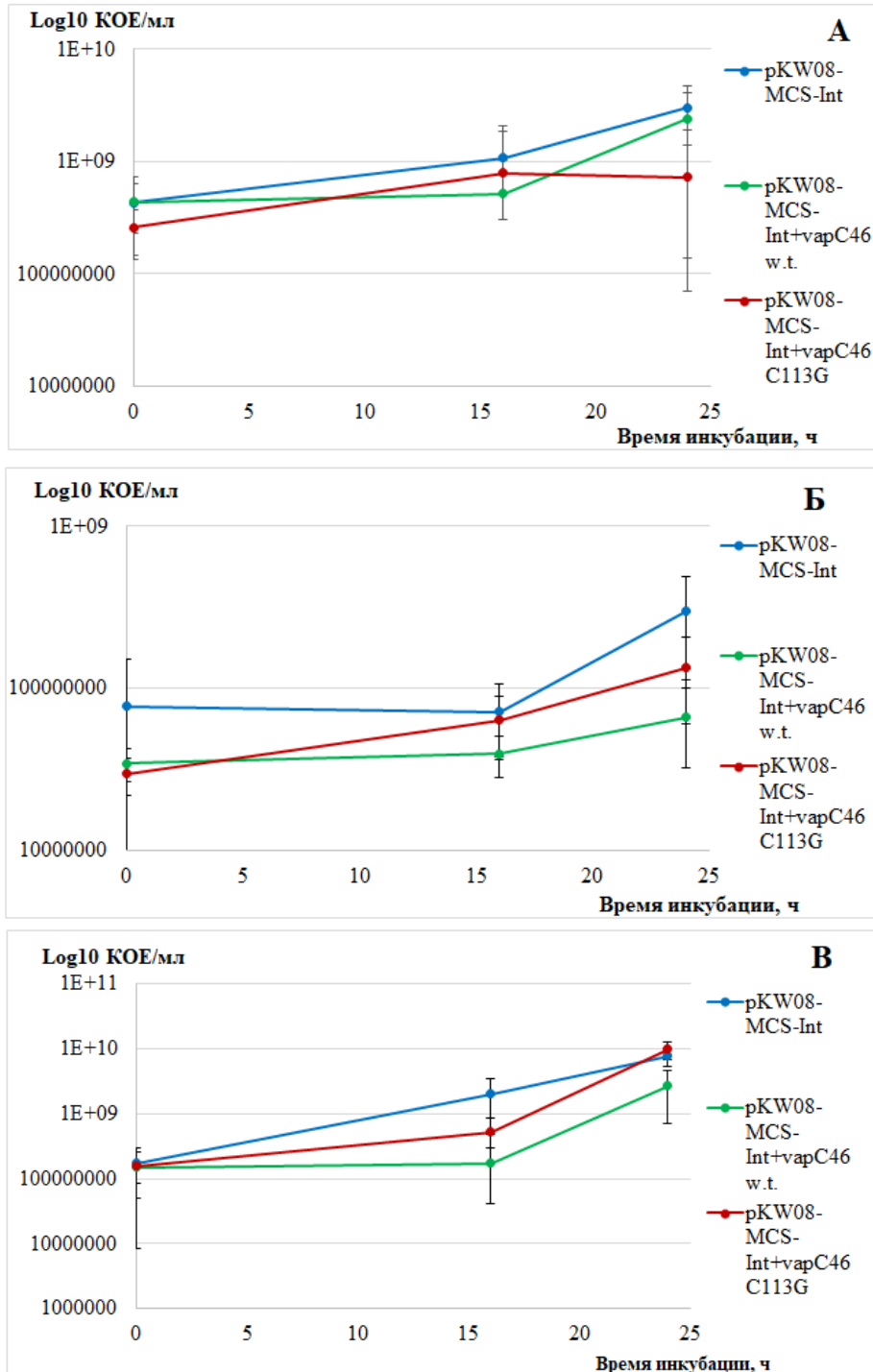


Рисунок 3.1.6.2. Динамика изменения числа КОЕ культуры трансформантов *M. smegmatis* pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + varC46 w.t., pKW08-MCS-Int + varC46 C₁₁₃G при инкубации

в минимальной среде (А), в минимальной среде без азота (Б) и минимальной среде без углерода (В). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

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

3.1.7. Выделение белка VarC46 дикого типа и его мутантного варианта для определения РНКазной активности

На первом этапе работы с белком VarC46 необходимо было определить, в составе какого вектора и экспрессионного штамма *E. coli* токсин может быть выделен в наибольшей концентрации. Для этого ген *varC46* дикого типа и его мутантный вариант были клонированы в экспрессионные векторные плазмиды pET28a и pET32a, после чего была осуществлена наработка полученных конструкций и трансформация ими компетентных клеток *E. coli* нескольких экспрессионных штаммов: BL21, NiCo, BL21 pLysS, BL21 Codon+ и B834. В результате выделения белка VarC46 из различных экспрессионных штаммов *E. coli* и последующего анализа методом электрофореза в полиакриламидном геле было обнаружено, что токсин VarC46 дикого типа и его мутантный вариант в наибольшей концентрации присутствуют в осадке штаммов *E. coli* NiCo и B834, трансформированных конструкциями pET32a + *varC46* w.t. и pET32a + *varC46* C₁₁₃G, соответственно (Рисунок 3.1.7.1.).

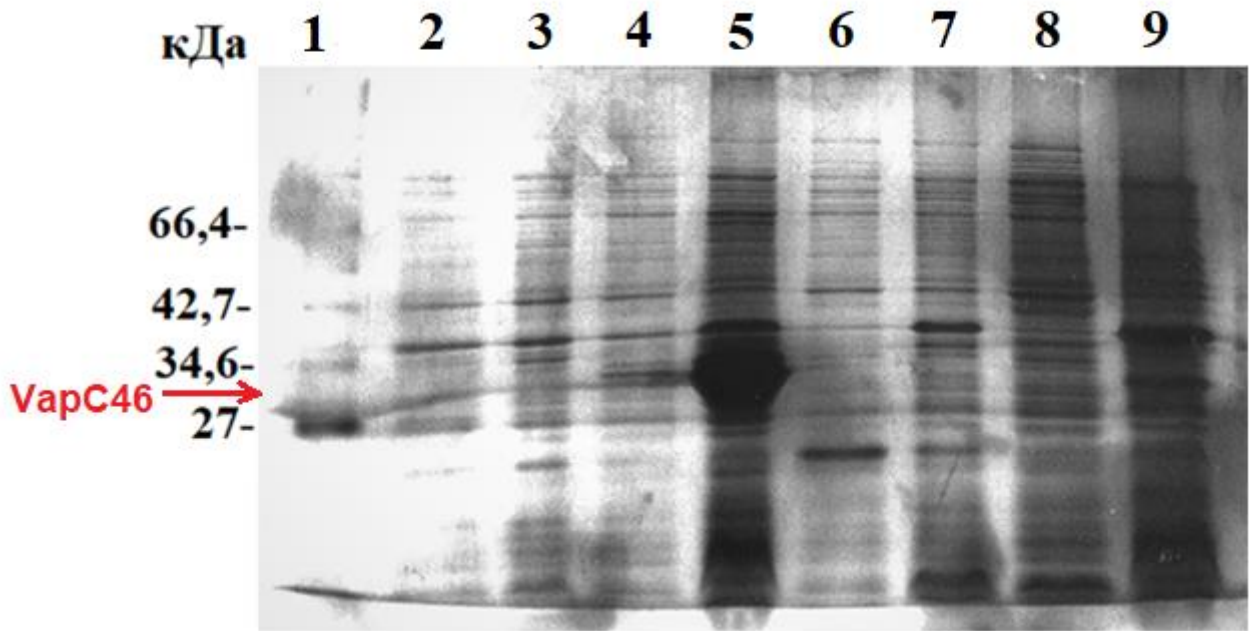


Рисунок 3.1.7.1. Электрофореграмма образцов после выделения белка VarC46 дикого типа и его мутантного варианта из двух фракций (осадок и супернатант) после постановки вертикального фореа в полиакриламидном геле. Цифрами обозначены образцы: 1 – Маркер Blue Prestained Protein Standard Broad range (NEB, Великобритания); 2 – *E. coli* B834 pET32a супернатант; 3 – *E. coli* B834 pET32a осадок; 4 – *E. coli* B834 pET32a + *varC46* C₁₁₃G супернатант; 5 – *E. coli* B834 pET32a + *varC46* C₁₁₃G осадок; 6 – *E. coli* NiCo pET32a супернатант; 7 – *E. coli* NiCo pET32a осадок; 8 – *E. coli* NiCo pET32a + *varC46* w.t. супернатант; 9 – *E. coli* NiCo pET32a + *varC46* w.t. осадок.

Из осадка клеток *E. coli* NiCo, трансформированных конструкцией pET32a+ *varC46* w.t., выделить белок VarC46 дикого типа в концентрациях, достаточных для проведения анализа РНКазной активности, не удалось. В связи с этим, для повышения растворимости и получения возможности выделения функционального белка VarC46 в ранее полученные конструкции pET28a+*varC46* w.t. и pET28a+*varC46* C₁₁₃G было осуществлено клонирование гена *tig* (AAA62791.1), кодирующего триггер-фактор *E. coli* [Roy et al., 2020]. Ген *tig* был клонирован в вектор pET28a по сайтам рестрикции *Xba*I-*Nco*I с включением сайта для TEV-протеазы между генами *tig* и *varC46*. Полученными конструкциями (pET28a-*tig*+*varC46* w.t. и pET28a-*tig*+*varC46* C₁₁₃G) были трансформированы экспрессионные штаммы *E. coli*. Показано, что после лизиса за счёт обработки ультразвуком в условиях, представленных в разделе «Материалы и методы», и последующего центрифугирования, в наибольшем количестве белок VarC46 w.t. представлен в супернатанте штамма *E. coli* BL21(DE3), а также в супернатанте штамма NiCo (Рисунок 3.1.7.2.).

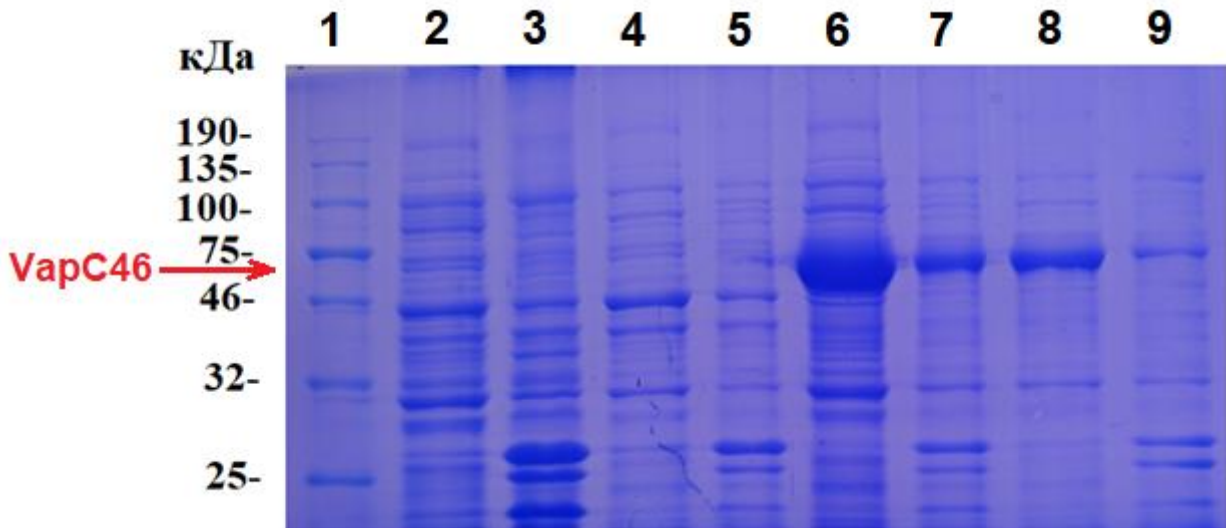


Рисунок 3.1.7.2. Электрофореграмма образцов после выделения белка VarC46 w.t. из двух фракций (осадок и супернатант) после постановки вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Цифрами обозначены образцы: 1 – Blue Protein Standard (NEB, Великобритания); 2 – *E. coli* BL21 pET28a-tig супернатант; 3 – *E. coli* BL21 pET28a-tig осадок; 4 – *E. coli* NiCo pET28a-tig супернатант; 5 – *E. coli* NiCo pET28a-tig осадок; 6 – *E. coli* BL21 pET28a-tig + vapC46 w.t. супернатант; 7 – *E. coli* BL21 pET28a-tig + vapC46 w.t. осадок; 8 – *E. coli* NiCo pET28a-tig + vapC46 w.t. супернатант; 9 – *E. coli* NiCo pET28a-tig + vapC46 w.t. осадок.

При этом мутантный белок VarC46 в наибольшей концентрации обнаруживался в супернатанте штамма NiCo (Рисунок 3.1.7.3). В меньших концентрациях он присутствовал в супернатанте штамма B834.

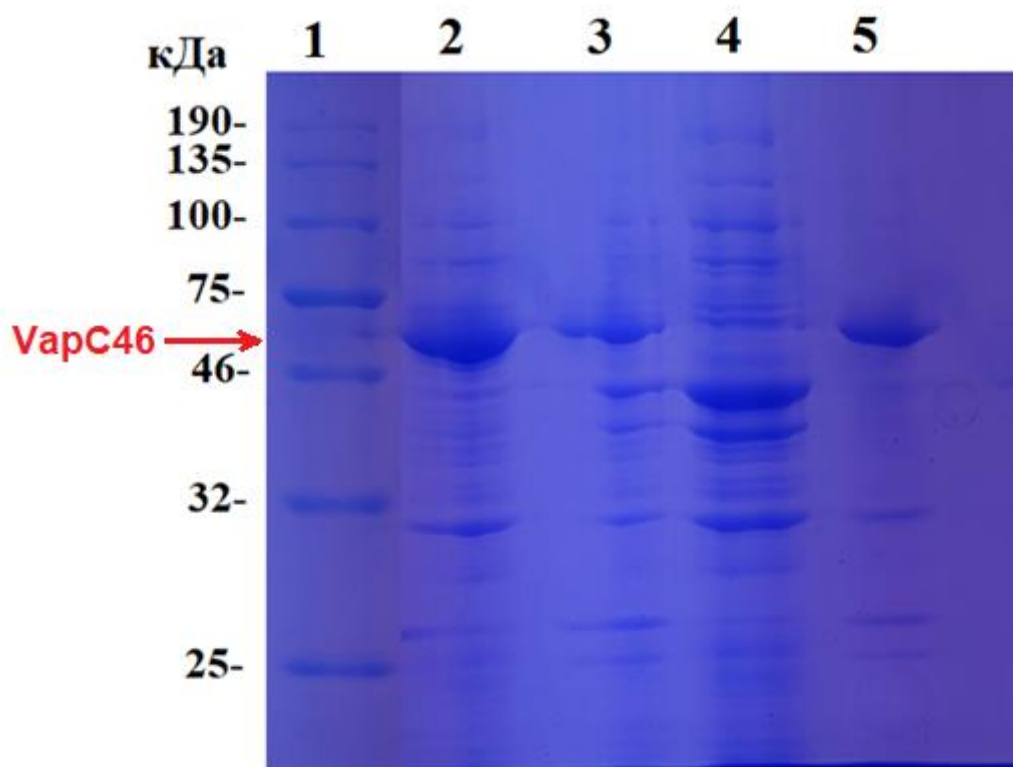


Рисунок 3.1.7.3. Электрофореграмма образцов белковых фракций, в том числе VarC46 C₁₁₃G, в осадках и супернатантах штаммов *E. coli* NiCo и B834 после постановки вертикального фореза в полиакриламидном геле. Цифрами обозначены образцы: 1 – Blue Protein Standard (NEB, Великобритания); 2 - *E. coli* NiCo pET28a + *varC46* C₁₁₃G супернатант; 3 - *E. coli* NiCo pET28a + *varC46* C₁₁₃G осадок; 4 - *E. coli* B834 pET28a + *varC46* C₁₁₃G осадок; 5 - *E. coli* B834 pET28a + *varC46* C₁₁₃G супернатант.

Для последующего исследования РНКазной активности белок токсина VarC46 дикого типа был выделен из штаммов *E. coli* BL21(DE3) и NiCo, трансформированных конструкцией pET28a-*tig*+*varC46* w.t. Выделение мутантного белка токсина VarC46 осуществляли из штамма *E. coli* NiCo, трансформированного конструкцией pET28a+*varC46* C₁₁₃G.

3.1.8. Оценка влияния мутации на РНКазную активность белка VarC46

В результате проведения исследования РНКазной активности было показано наличие РНКазной активности, как у токсина VarC46 дикого типа, так и у его мутантного варианта (Рисунок 3.1.8.1). 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.

Следует подчеркнуть, что в данной работе проводилась оценка РНКазной активности токсина VarC46 лишь в отношении мРНК. Исследование рибонуклеазной активности VarC46 в

отношении клеточных рРНК и тРНК в рамках данной работы проведено не было. В связи с этим по результатам работы можно сделать однозначный вывод об отсутствии выраженного влияния мутации С₁₁₃G *varC46* на РНКазную активность токсина VarC46 лишь в отношении мРНК.

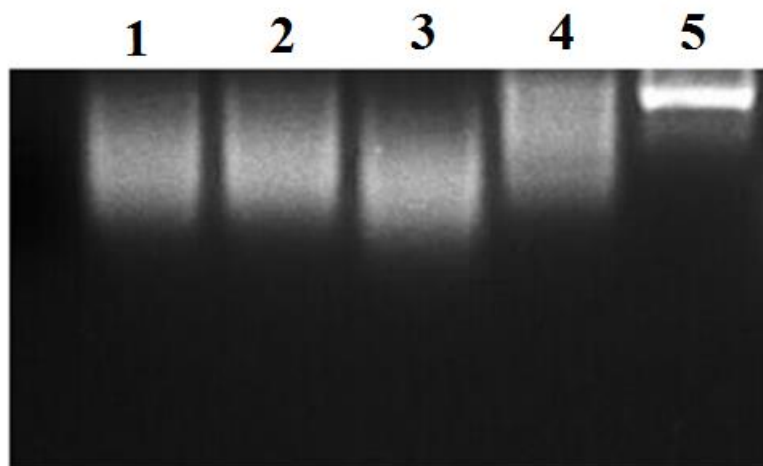


Рисунок 3.1.8.1. Электрофореграмма образцов при оценке РНКазной активности (2 ч инкубация). Цифрами обозначены образцы: 1 – VarC46 w.t., выделенный из *E. coli* BL21; 2 – VarC46 w.t., выделенный из *E. coli* NiCo; 3 – VarC46 mut, выделенный из *E. coli* NiCo; 4 – VarC2 *B. longum*; 5 – РНК бактериофага MS2.

Заключение к разделу 3.1.

Системы ТА могут играть важную роль в адаптации бактериальных клеток к стрессовым воздействиям различной природы. За счёт взаимодействий, возникающих между токсином и антитоксином, может осуществляться регуляция ключевых клеточных процессов. Системы ТА II типа являются наиболее распространённой группой систем ТА среди бактерий. В частности, у *M. tuberculosis* в настоящее время описано порядка 70 систем ТА II типа [Bordes et al., 2021]. Проведённый в более ранних работах анализ транскрипции модулей ТА *M. tuberculosis* в условиях воздействия стрессовых факторов различной природы выявил изменение уровня экспрессии большей части модулей ТА *M. tuberculosis* в условиях воздействия того или иного стрессового фактора среды [Gupta et al., 2017]. Одним из немногих модулей ТА, экспрессия которых активируется в ответ на стрессовые факторы различной природы (воздействие антибиотиков, низкий рН и недостаточное поступление питательных соединений), является *varBC46* [Gupta et al., 2017]. Данные результаты позволяют предположить, что система ТА VarBC46 является одним из ключевых регуляторов адаптации бактериальных клеток к стрессовым воздействиям, который координирует функционирование других систем ТА [Gupta et al., 2017]. Ранее была осуществлена биохимическая характеристика данной системы ТА [Roy

et al., 2020]. Однако экспериментальные данные относительно участия системы TA VarBC46 в адаптации к стрессовым воздействиям, отсутствуют. Также ранее не исследовалось влияние мутации в гене токсина *varC46* на его функцию. Особый интерес представляет мутация C₁₁₃G *varC46*, обнаруженная в высоковирулентной сублинии Beijing-B0-148 в составе устойчивого комплекса мутаций [Mikheecheva N.E. et al., 2017]. В связи с тем, что мутация C₁₁₃G локализована рядом с активным центром белка токсина, она, предположительно, может оказывать влияние на его функциональную активность. Оценка значимости однонуклеотидной замены C₁₁₃G с использованием алгоритма PredictSNP показала, что данная мутация может повлиять на физико-химические свойства токсина VarC46. Анализ структурных моделей токсина дикого типа и его мутантного варианта, полученных с использованием программы trRosetta, показал, что однонуклеотидная замена C₁₁₃G, вероятно, приводит к структурным изменениям активного центра белка VarC46.

Roy (2020) было проведено исследование влияния экспрессии гена токсина *varC46* на рост *M. smegmatis* в нормальных условиях, по результатам которого было показано, что экспрессия *varC46* приводит к замедлению роста *M. smegmatis*. В данной работе впервые изучено влияние мутации C₁₁₃G *varC46* на рост *M. smegmatis* в отсутствие стрессовых воздействий.

Анализ кривой роста, полученной в ходе настоящего исследования, показал статистически значимое замедление роста клеток *M. smegmatis*, несущих конструкции с геном *varC46* дикого типа. Напротив, вставка мутантного варианта гена *varC46* не приводила к замедлению роста относительно контроля. Замедление роста при вставке гена *varC46* дикого типа и отсутствие такого замедления при вставке мутантного варианта может быть связано с изменением либо РНКазной активности токсина VarC46, либо взаимодействий между токсином и антитоксином, либо субстратной специфичности токсина в результате мутации. При исследовании рибонуклеазной активности токсина VarC46 было обнаружено, что мутация в гене *varC46* слабо влияет на РНКазную активность токсина в отношении мРНК. При этом оценка РНКазной активности VarC46 с использованием в качестве субстрата тРНК и рРНК в рамках данной работы не проводилась. Кроме того, мутация C₁₁₃G может приводить к утрате способности токсина VarC46 узнавать некоторые последовательности и осуществлять деградацию РНК, содержащих данные сайты. Как следствие – отсутствие замедления роста трансформантов *M. smegmatis* с мутантным вариантом VarC46. В качестве другой вероятной причины, лежащей в основе обнаруженных различий, могло быть рассмотрено изменение взаимодействий между токсином и антитоксином в результате мутации *varC46* C₁₁₃G. Однако в геноме *M. smegmatis* не обнаружены гомологи модуля *varBC46*. Кроме того, в рамках данной работы было осуществлено клонирование и экспрессия в клетках *M. smegmatis* исключительно гена токсина *varC46*, без

антитоксина *varB46*. Поэтому вышеуказанные факторы не позволяют рассматривать изменение взаимодействий между токсином и антитоксином в качестве главного результата мутации С₁₁₃G. В совокупности, на основании полученных данных можно предположить, что ингибирование роста *M. smegmatis*, вероятно, связано с изменением специфичности токсина VarC46 в результате мутации С₁₁₃G или с изменением его РНКазной активности в отношении тРНК и рРНК бактериальных клеток.

В более ранних работах было показано достоверное повышение уровня экспрессии генов модуля *varBC46* в ответ на стрессовые воздействия различной природы [Gupta et al., 2017]. В данной работе было впервые проведено исследование роли токсина VarC46 в адаптации бактериальных клеток к стрессу, которое показало участие VarC46 в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс. В частности, было установлено, что вставка гена токсина *varC46* как дикого типа, так и мутантного варианта приводит к статистически значимому повышению выживаемости клеток *M. smegmatis* в условиях кратковременного воздействия (до 0,5 ч) 0,5 mM H₂O₂, не влияя на выживаемость в условиях более длительного воздействия окислительного стресса (1-2 ч). При продолжительной инкубации в присутствии 0,5 mM H₂O₂ наблюдалось резкое снижение выживаемости и числа КОЕ всех трансформантов *M. smegmatis*. Анализ динамики изменения оптической плотности в присутствии 0,5 mM H₂O₂ показал, что хотя и наблюдается статистически достоверное снижение оптической плотности культуры на протяжении всего периода инкубации, но оно выражено в меньшей степени, чем уменьшение числа КОЕ. В совокупности, полученные данные позволяют предположить, что длительная инкубация в присутствии 0,5 mM H₂O₂ приводит к гибели клеток *M. smegmatis*, которая не сопровождается их лизисом.

Анализ динамики роста и оценка числа КОЕ *M. smegmatis* в условиях стресса, связанного с лимитированием источников азота и углерода, показали отсутствие статистически значимых различий между тремя исследованными группами трансформантов (pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *varC46* w.t., pKW08-MCS-Int + *varC46* С₁₁₃G). Полученные результаты указывают на то, что данная система ТА, вероятно, не участвует в регуляции адаптации к стрессу, связанному с недостаточным поступлением источников азота и углерода.

В работе Gupta (2017) также было обнаружено повышение уровня экспрессии генов, кодирующих как антитоксин (*varB46*), так и токсин (*varC46*) при инкубации в присутствии антибиотиков. В частности, было показано статистически достоверное повышение уровня экспрессии *varB46* и *varC46* в присутствии рифампицина [Gupta et al., 2017]. В рамках данного исследования изменение уровня устойчивости к рифампицину у трансформантов *M. smegmatis*,

несущих вставку гена *varC46* дикого типа, либо его мутантного варианта, обнаружено не было. Это может быть связано с тем, что для регуляции устойчивости к рифампицину необходимо взаимодействие токсина VarC46 с антитоксином VarB46. Кроме того, было показано, что вставка *varC46* дикого типа приводит к повышению устойчивости к офлоксацину. Также было обнаружено повышение устойчивости к эритромицину у трансформантов *M. smegmatis*, несущих ген *varC46* как дикого типа, так и его мутантный вариант.

Таким образом, можно заключить, что хотя мутация C₁₁₃G в гене *varC46* не оказывает выраженного положительного влияния на выживаемость бактериальных клеток в условиях исследованных нами стрессовых факторов, в совокупности с мутациями в других генах вирулентности она может играть важную роль в адаптации к стрессовым воздействиям различной природы.

3.2. 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 3.2.1.).

Таблица 3.2.1. 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

Штаммы с делецией были получены с использованием метода сайт-направленного мутагенеза. Подробная схема получения делеционных мутантов *M. smegmatis* представлена в разделе «Материалы и методы» (Рисунок 2.2.4.1.).

3.2.1. 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 3.2.1.1.). На основании полученных результатов можно предположить, что модуль *varBC2* участвует в регуляции роста *M. smegmatis* при нормальных условиях инкубации.

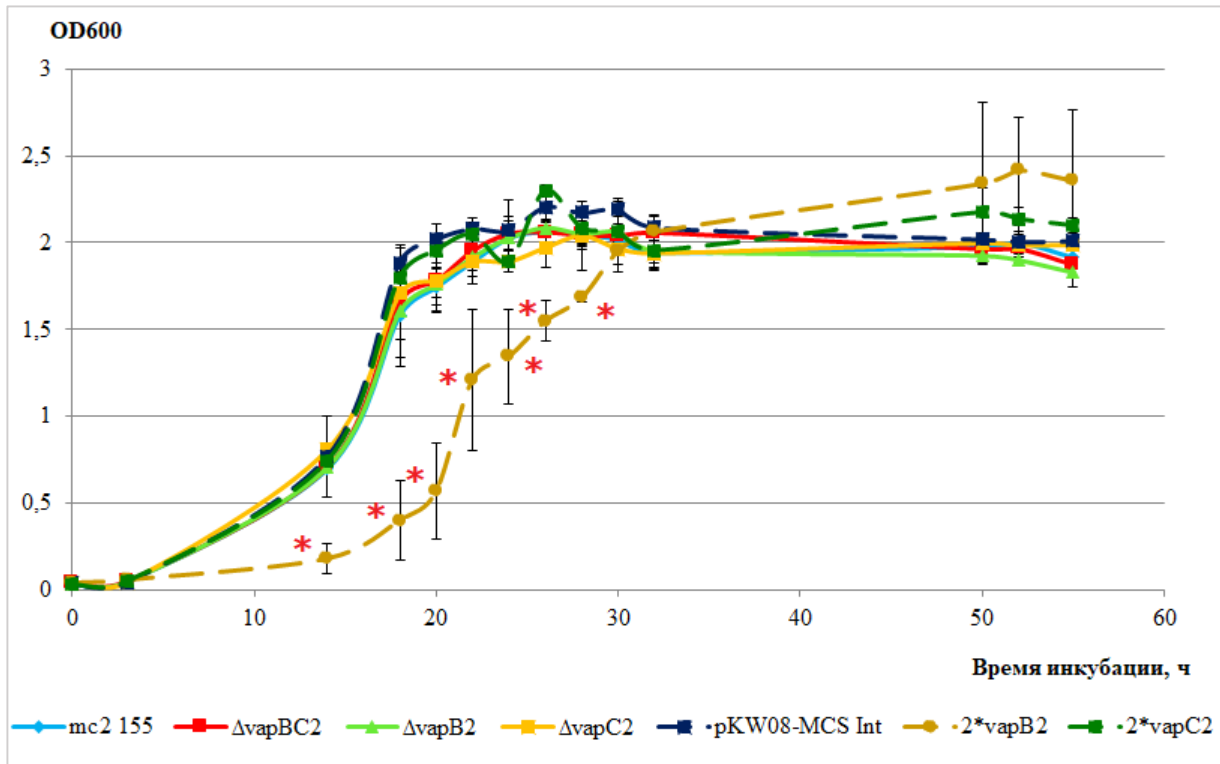


Рисунок 3.2.1.1. Кривая роста штаммов *M. smegmatis* при инкубации в отсутствие стрессовых воздействий. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

3.2.2. Анализ влияния модуля *varBC2* на чувствительность клеток *M. smegmatis* к антибиотикам

В ходе оценки минимальных ингибирующих концентраций эритромицина, офлоксацина, рифампицина и канамицина было показано отсутствие отличий в уровне устойчивости к офлоксацину, рифампицину и канамицину от контрольных штаммов как у делеционных мутантов *M. smegmatis*, так и у трансформантов с дополнительными копиями генов *varB2* и *varC2* (Рисунок 3.2.2.1.). Полученные данные позволяют предположить, что система ТА VarBC2, вероятно, не участвует в регуляции устойчивости к данным антибиотикам.

Вместе с тем было обнаружено снижение МИК эритромицина для штамма *M. smegmatis* с дополнительной копией гена токсина. Таким образом, экспрессия дополнительной копии гена *varC2* приводит к повышению чувствительности *M. smegmatis* к эритромицину.

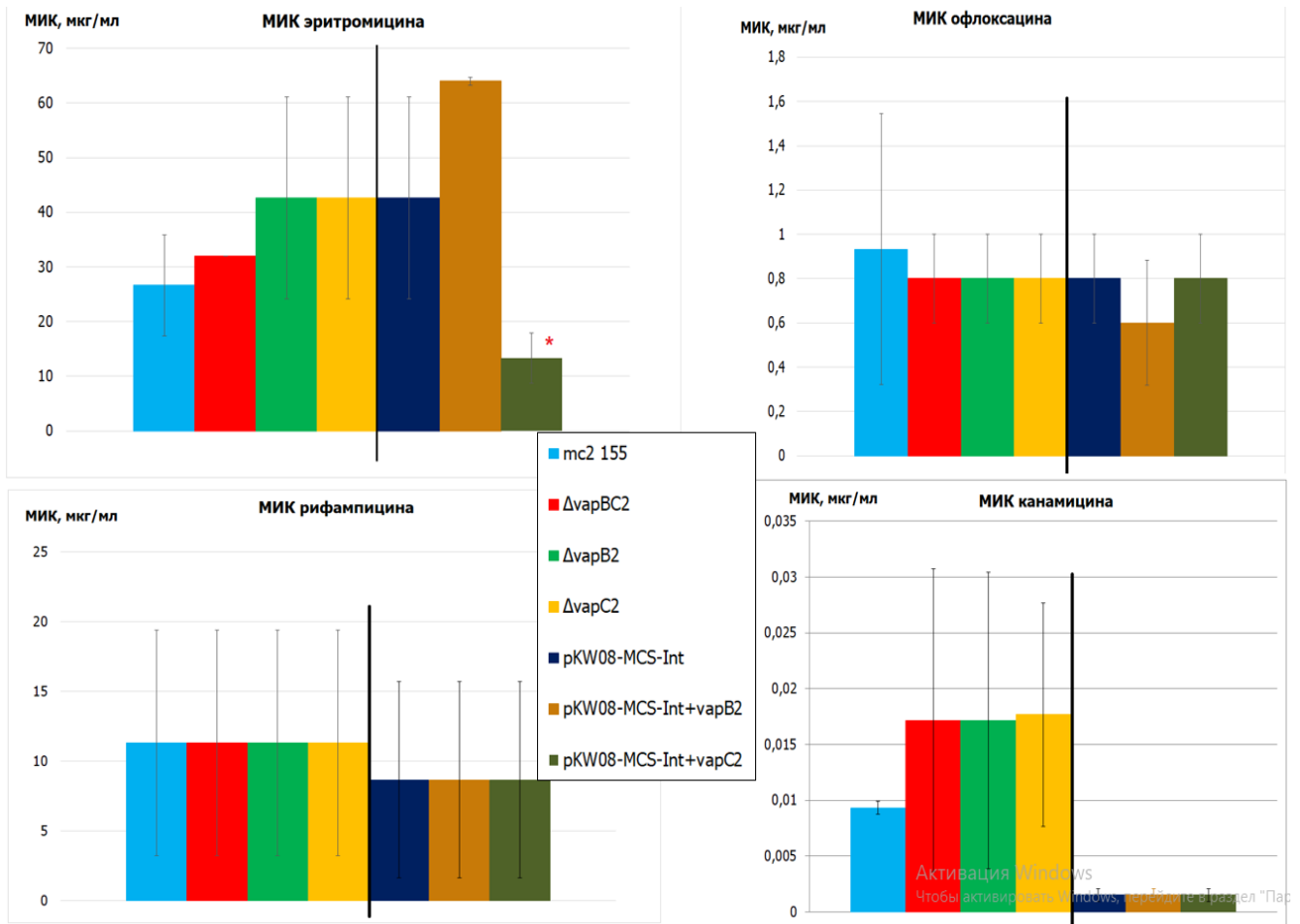


Рисунок 3.2.2.1. Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (мкг/мл) для трансформантов *M. smegmatis*. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

3.2.3. 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 контроля (Рисунок 3.2.3.1).

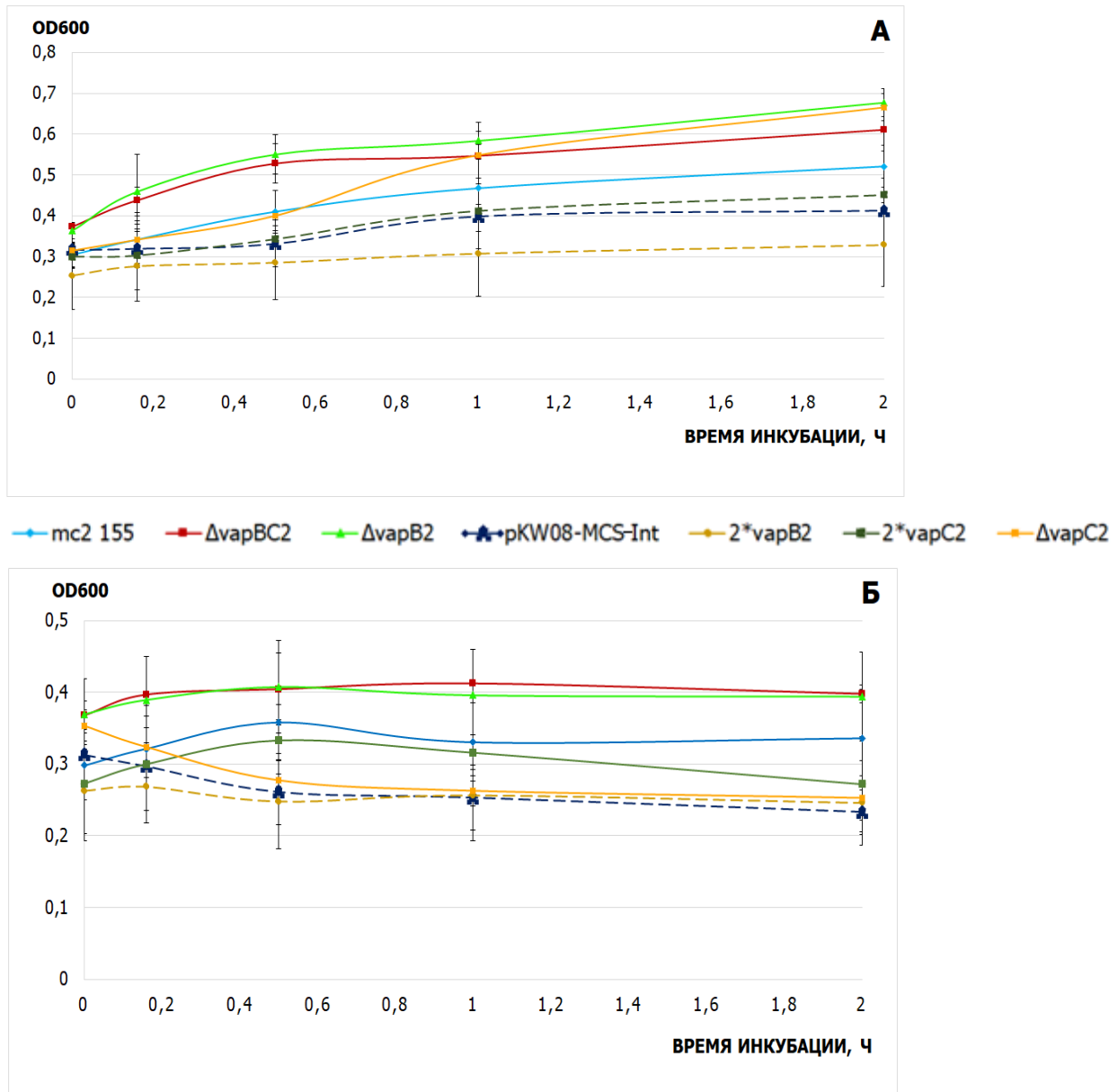


Рисунок 3.2.3.1. Динамика изменения оптической плотности (OD₆₀₀) культуры штаммов *M. smegmatis* mc²155, ΔvapBC2, ΔvapB2, ΔvapC2, pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + vapB2, pKW08-MCS-Int + vapC2 в нормальных условиях роста (А) и при воздействии 0,5 mM H₂O₂ (Б). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

Подсчёт числа КОЕ с последующей оценкой выживаемости *M. smegmatis* в условиях воздействия 0,5 mM H₂O₂ подтвердили отсутствие отличий в устойчивости к окислительному стрессу делеционных штаммов *M. smegmatis* и штаммов с дополнительными копиями vapB2 и vapC2 от контрольных штаммов *M. smegmatis* (mc2 155 и pKW08-MCS-Int, соответственно) (Рисунки 3.2.3.2.-3.2.3.3.).

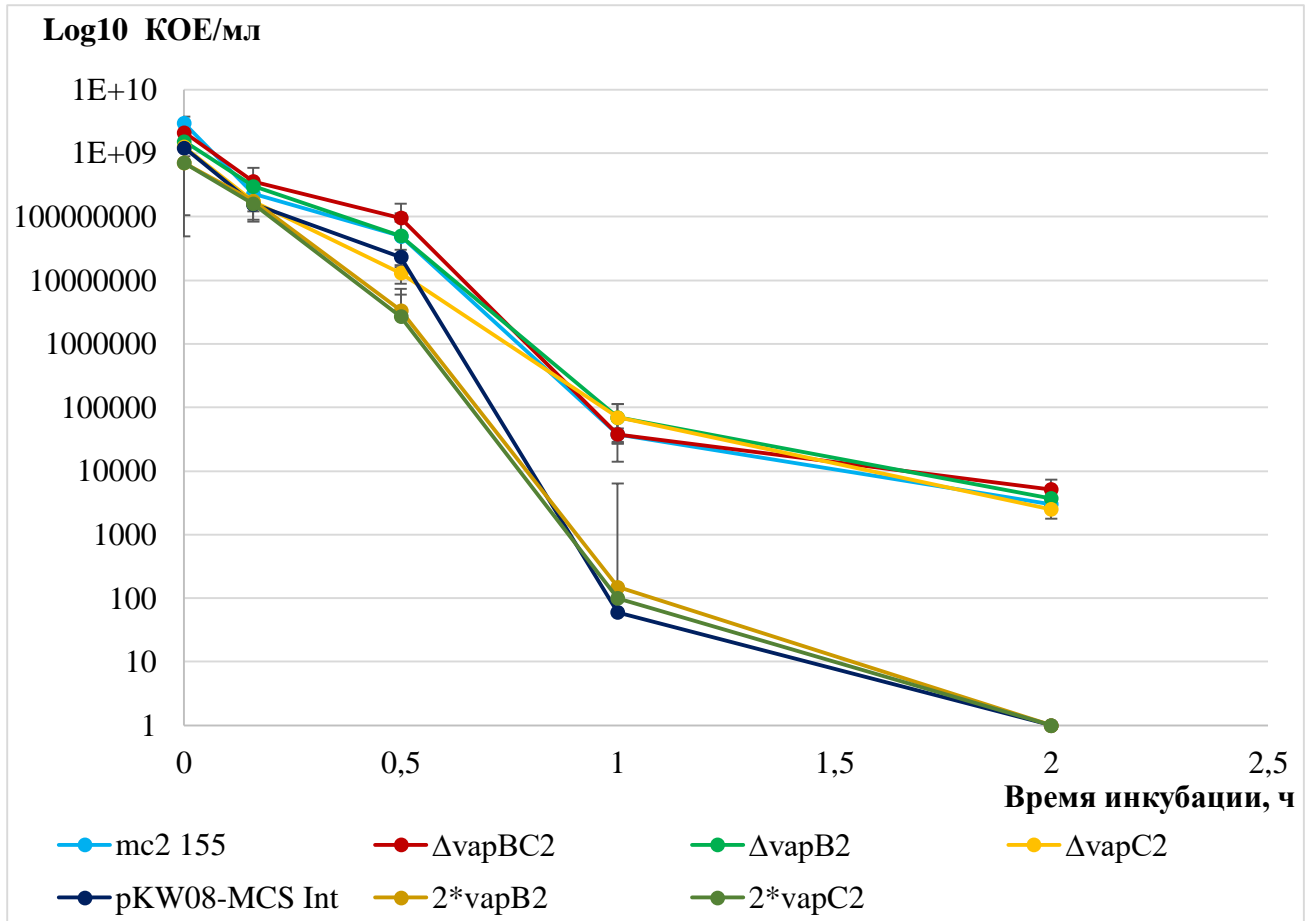


Рисунок 3.2.3.2. Динамика изменения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) штаммов *M. smegmatis* при воздействии 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

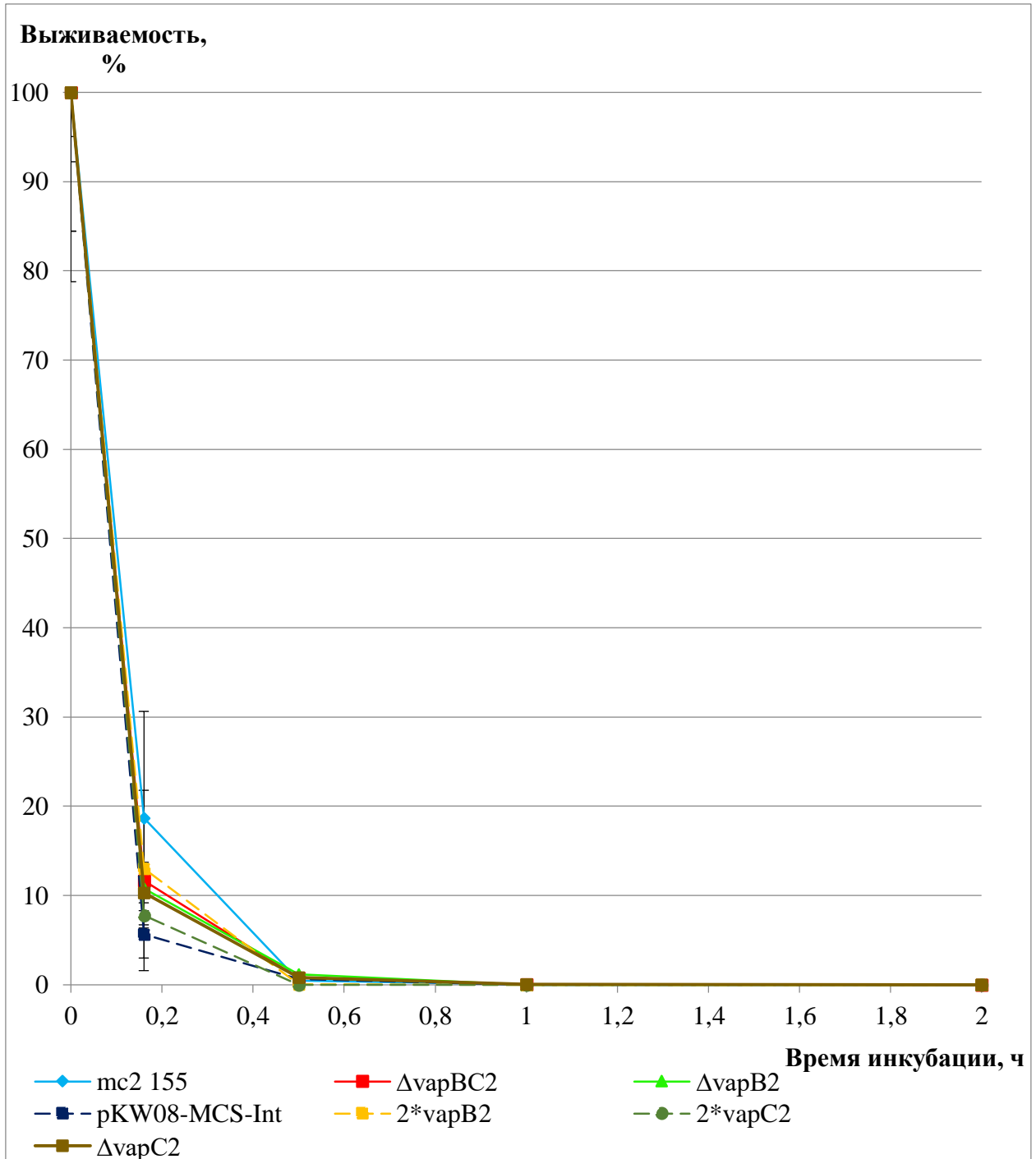


Рисунок 3.2.3.3. Динамика выживаемости штаммов *M. smegmatis* mc2 155, $\Delta vapBC2$, $\Delta vapB2$, $\Delta vapC2$, pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *vapB2*, pKW08-MCS-Int + *vapC2* в условиях воздействия 0,5 mM H₂O₂. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах.

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 ГА *vapBC2*, не участвует в регуляции устойчивости к окислительному стрессу.

3.2.4. 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 VarBC2 с другими системами TA *M. smegmatis* (Рисунок 3.2.4.1.). На основании близкого расположения генов, кодирующих белки MSMEG_6763, MSMEG_6764, с генами модуля *varBC2* *M. smegmatis* предполагается наличие взаимодействий между данными белками.

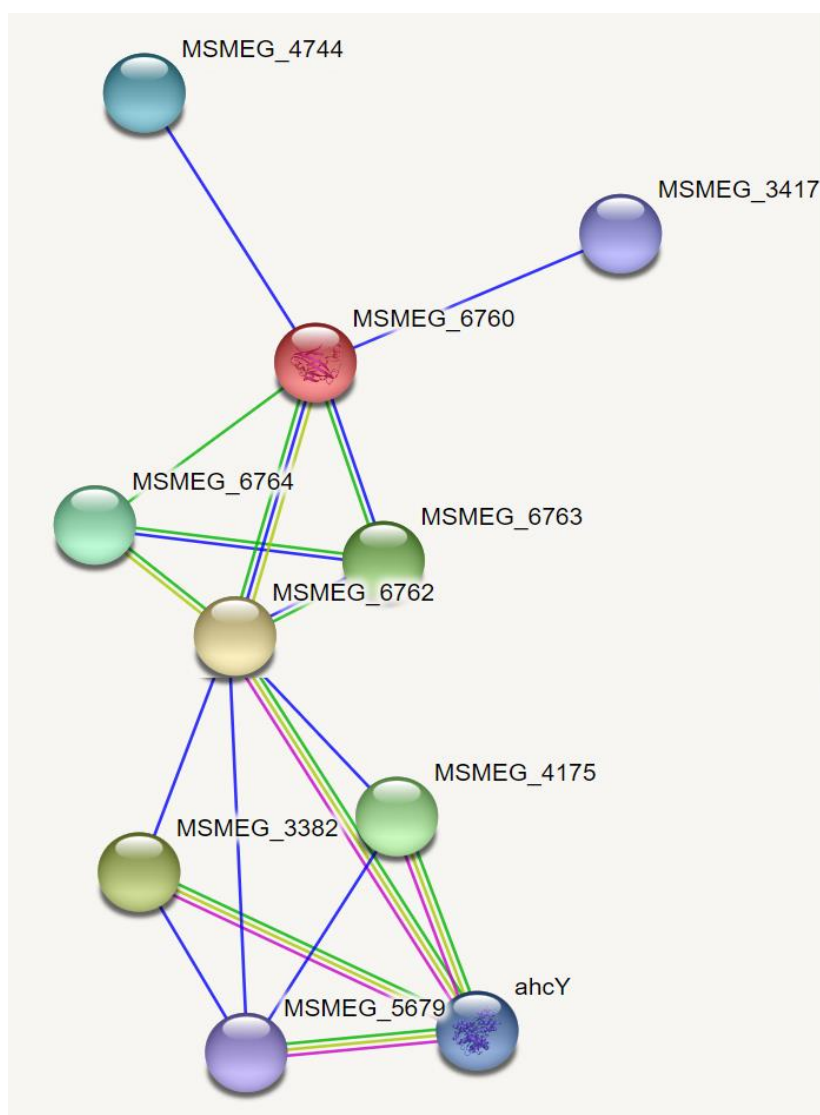


Рисунок 3.2.4.1. Схема, иллюстрирующая предполагаемые взаимодействия между антитоксином VarB2 (MSMEG_6762), токсином VarC2 (MSMEG_6760) и другими белками *M. smegmatis* на основании базы данных STRING (<https://string-db.org/>). Цветными линиями обозначены взаимодействия: синяя линия – взаимодействие предполагается на основании совместного появления генов; зелёная линия – взаимодействия между белками на основании близкого расположения кодирующих их генов; салатная линия – взаимодействия предполагаются на основании совместного появления генов в текстах статей, рисунках, схемах и т.д.; розовая линия – взаимодействия между белками, установленные экспериментально.

3.2.5. Анализ влияния модуля *vapBC2* на уровень экспрессии генов *MSMEG_6764*, *MSMEG_5244* и *MSMEG_3944*

Согласно данным литературы, гомолог антитоксина у *M. tuberculosis* Rv2034 является позитивным регулятором генов регулона DosR [Gao et al., 2012]. DosR участвует в переходе бактериальных клеток в дормантное состояние при стрессовых воздействиях, преимущественно при гипоксии [Bajai et al., 2016]. Известно, что ген *MSMEG_5244* кодирует белок, являющийся ключевым регулятором DosR [Berney et al., 2014]. В геноме *M. smegmatis* также описан гомолог *MSMEG_5244* - *MSMEG_3944*. Предположительно, антитоксин *vapB2* у *M. smegmatis* также может участвовать в регуляции генов регулона DosR - *MSMEG_5244* и *MSMEG_3944*.

С помощью анализа генных взаимодействий с использованием базы данных STRING (https://string-db.org/network/246196.MSMEI_6579) было выявлено наличие взаимодействий между антитоксином *vapB2*, токсином *vapC2* (*MSMEG_6760*) и регулятором транскрипции *tetR* (*MSMEG_6764*).

Для определения наличия взаимодействий между *VapBC2* 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, штамма с делецией модуля *vapBC2* ($\Delta vapBC2$) и штамма с дополнительной копией гена токсина ($2* vapC2$).

Анализ транскрипционной активности генов *MSMEG_6764*, *MSMEG_5244* и *MSMEG_3944* показал изменение уровня транскрипции гена, кодирующего регуляторный белок семейства *tetR* (*MSMEG_6764*) (Рисунок 3.2.5.1.).

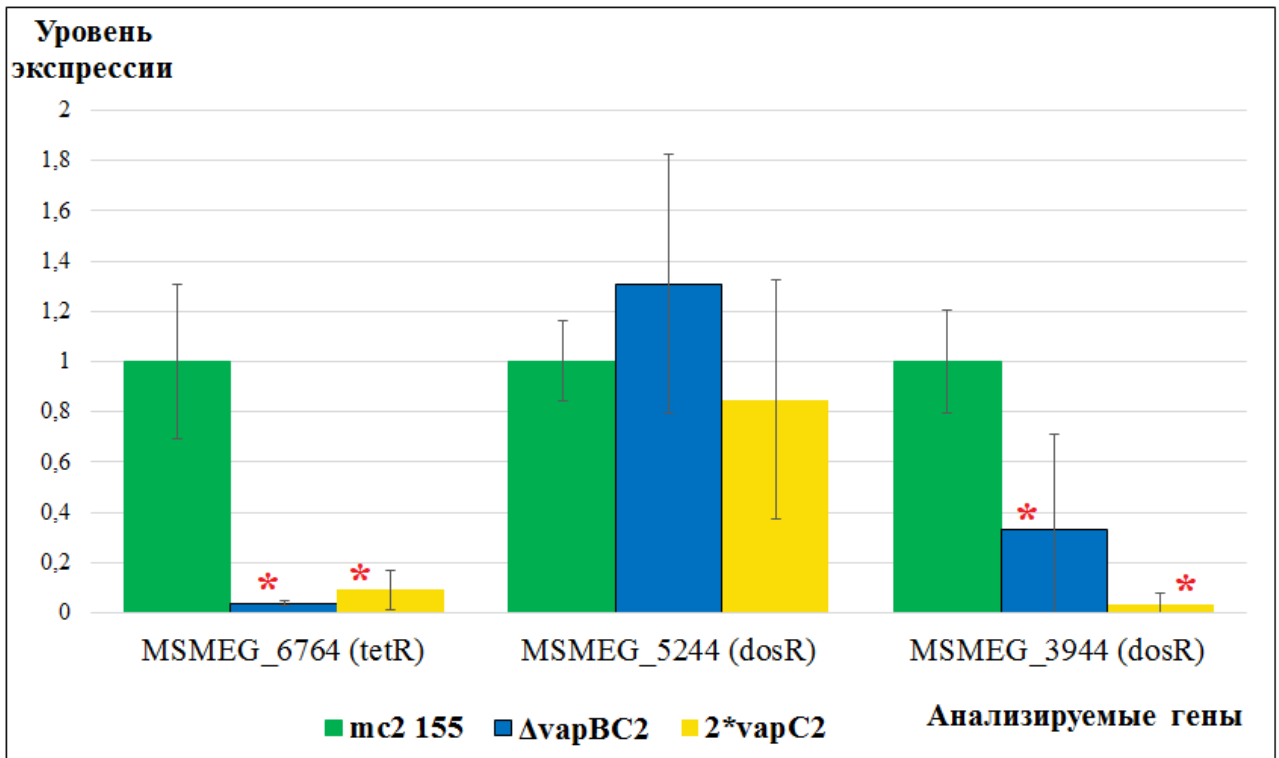


Рисунок 3.2.5.1. Уровень экспрессии генов *MSMEG_6764*, *MSMEG_5244* и *MSMEG_3944* в штаммах *M. smegmatis*. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Было обнаружено, что делеция модуля *varBC2* 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* может участвовать в активации транскрипции *MSMEG_6764* и *MSMEG_3944*. При делеции происходит утрата его функции, а экспрессия дополнительной копии гена токсина *varC2* может приводить к отсутствию свободного 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*.

Кроме того, было показано, что ни делеция *varBC2*, ни экспрессия дополнительной копии гена токсина *varC2* не влияют на уровень экспрессии гена из другого оперона *dosR* - *MSMEG_5244*.

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

В некоторых работах содержатся данные об участии токсина VarC2 в метаболизме глицерина [McKenzie *et al.*, 2012]. Было обнаружено, что рядом с модулем *varBC2* расположен кластер генов, участвующих в транспорте и метаболизме глицерина (Рисунок 3.2.6.1). Кроме того, предполагается, что белок MSMEG_6760 (VarC2) непосредственно участвует в метаболизме глицерина, однако его точная функция в данном процессе неизвестна.

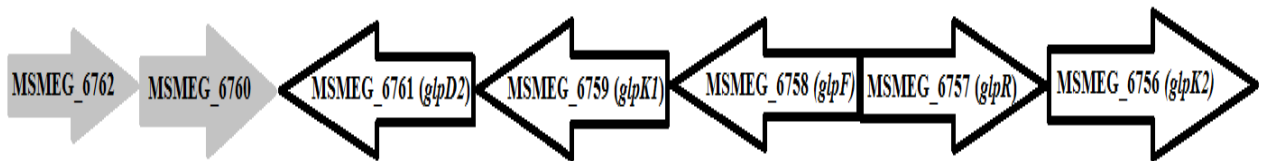


Рисунок 3.2.6.1. Схема расположения модуля TA *varBC2* и кластера генов, участвующих в транспорте и метаболизме глицерина у *M. smegmatis* (По McKenzie *et al.*, 2012). На схеме обозначены гены: *glpD2* - глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа 2, *glpK1*, *glpK2* – глицерол киназа, *glpF* – транспортный интегральный мембранный белок, *glpR* – регулятор транскрипции оперона.

Для подтверждения данного предположения было проведено исследование скорости роста штаммов *M. smegmatis mc² 155*, $\Delta varBC2$, $\Delta varB2$, $\Delta varC2$, pKW08-MCS-Int, pKW08-MCS-Int + *varB2*, pKW08-MCS-Int + *varC2* в среде 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 3.2.6.2.).

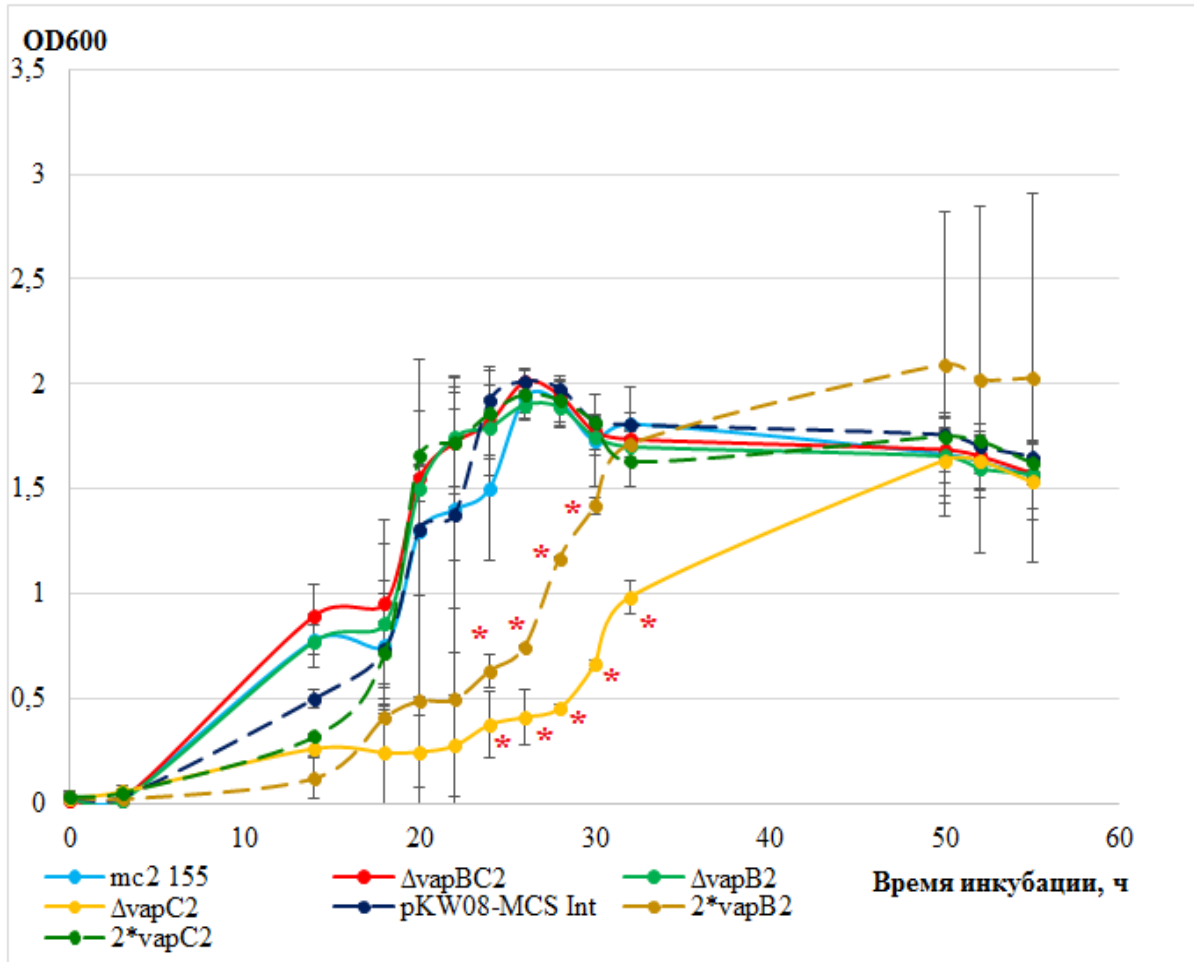


Рисунок 3.2.6.2. Кривая роста штаммов *M. smegmatis* при инкубации в среде 7H9 с минимальным содержанием глицерина. Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трёх независимых повторах. (*) – обозначены результаты, достоверно отличающиеся от контрольных значений, согласно статистическому критерию ANOVA.

Данный результат действительно позволяет предположить участие *VapC2* в метаболизме глицерина. Вероятно, делеция гена токсина *vapC2* 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 *vapC2* ($\Delta vapC2$), но и у трансформантов с дополнительной копией гена антитоксина *vapB2* ($2*vapB2$). При сопоставлении кривых роста на среде с минимальным содержанием глицерина и на контрольной среде (Рисунок 3.2.1.1.) обнаруживается, что замедление скорости роста трансформантов $2*vapB2$ сохраняется, в то время как у штамма $\Delta vapC2$ в контрольной среде восстанавливается нормальный рост. Это позволяет предположить наличие дополнительного механизма участия системы ТА *VapBC2* в регуляции роста *M. smegmatis*. Вероятно, замедление роста у трансформантов *M. smegmatis* с дополнительной копией гена антитоксина *vapB2* в контрольной среде и среде с минимальным глицерином может быть связано с активацией нуклеазы MSMEG_1275, описанной ранее в работе

Duan et al. (2022). Основываясь на данных, полученных Duan et al, 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.

3.2.7. Выделение белка VarC2 для дальнейшей оценки его РНКазной и шаперонной активности

Как и при работе с белком VarC46, перед выделением белка VarC2 первостепенная задача заключалась в определении конструкции и экспрессионного штамма, при использовании которых белок может быть выделен в максимальной концентрации без потери функциональной активности. Было установлено, что в наибольшей концентрации белок VarC2 выделяется из штаммов *E. coli* BL21 и NiCo, трансформированных конструкцией pET28a+*varC2*. При этом белок присутствует как в надосадочной жидкости, так и в осадке (Рисунок 3.2.7.1).

В дальнейшем для выделения белка VarC2 в нативном виде и анализа его РНКазной и шаперонной активности использовали надосадочную фракцию из штамма NiCo, т.к. свойства данного штамма (Таблица 2.1.1.1.) позволяют снизить концентрацию нецелевых белков при выделении.

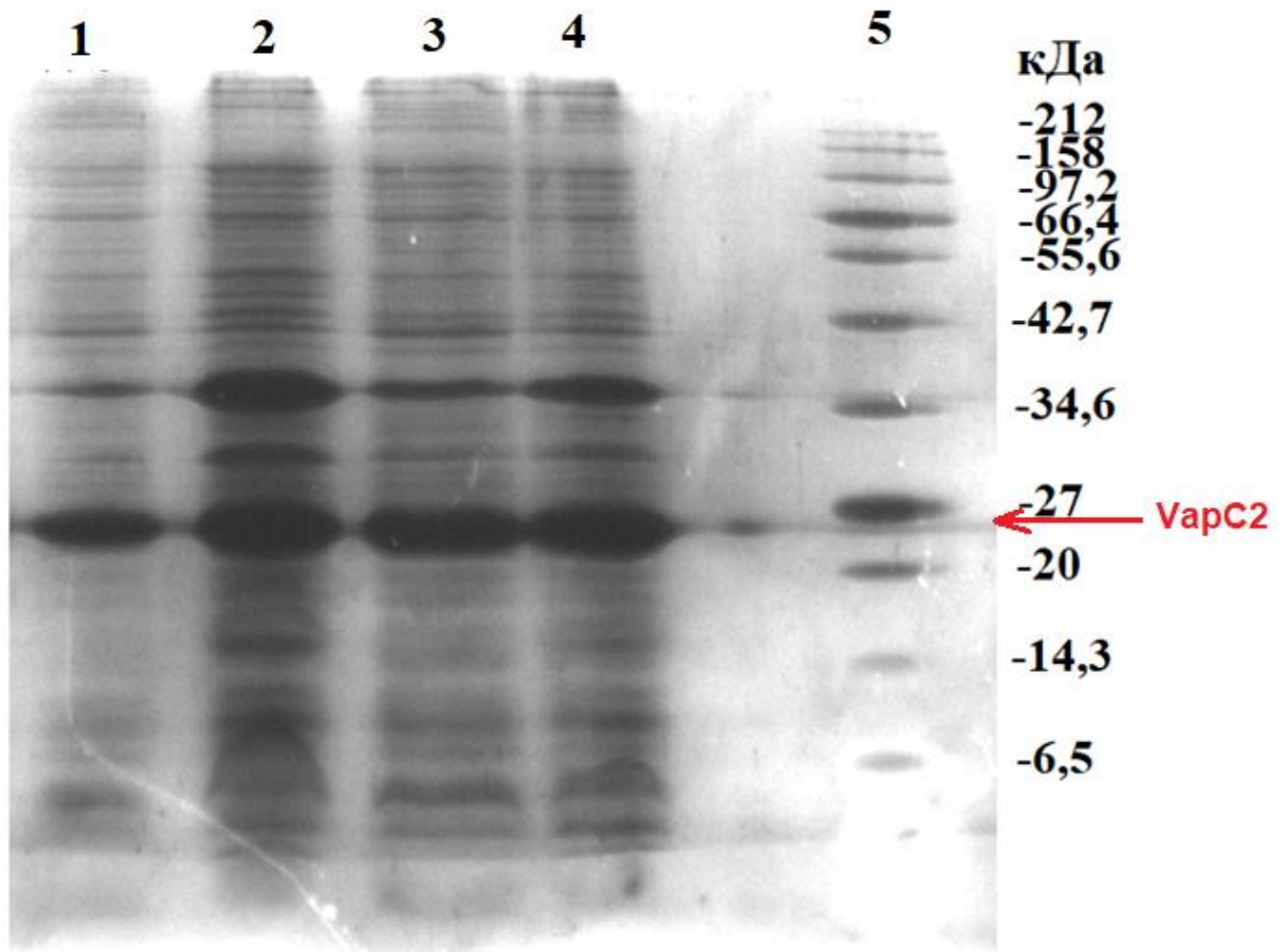


Рисунок 3.2.7.1. Электрофореграмма образцов после выделения белка VarC2 из двух фракций (осадок и супернатант) после постановки вертикального фореза в полиакриламидном геле. Цифрами обозначены образцы: 1 - *E. coli* BL21 pET28a + *varC2* супернатант; 2 - *E. coli* BL21 pET28a + *varC2* осадок; 3 - *E. coli* NiCo pET28a + *varC2* супернатант; 4 - *E. coli* NiCo pET28a + *varC2* осадок; 5 - Маркер Blue Prestained Protein Standard Broad range (NEB, Великобритания).

3.2.8. Оценка РНКазной активности белка VarC2

В ходе проведения исследования было показано наличие РНКазной активности у белка VarC2 (Рисунок 3.2.8.1). Токсин VarC2 в большей степени деградирует РНК MS2, чем токсин VarC из *Bifidobacterium longum*. Таким образом, экспериментально подтверждено наличие рибонуклеазной активности, предположение о которой было впервые было сформулировано в работе Вајај (2016) на основании результатов рентгеноструктурного и биоинформатического анализа.

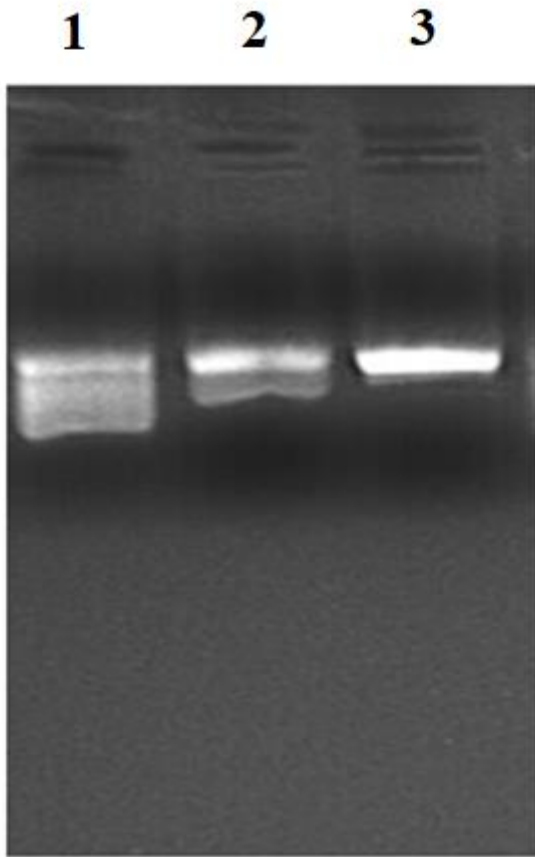


Рисунок 3.2.8.1. Электрофореграмма образцов при оценке РНКазной активности (1 ч инкубация). На рисунке цифрами обозначены образцы: 1 – VarC2 *M. smegmatis*; 2 – VarC2 *B. longum*; 3 – РНК бактериофага MS2.

3.2.9. Определение шаперонной активности белка VarC2 с использованием β -галактозидазы

В ходе оценки шаперонной активности с использованием β -галактозидазы было показано отсутствие статистически достоверных различий между образцами, которые содержали β -галактозидазу и DnaK с добавлением и без добавления токсина VarC2 в реакционную смесь (Таблица 3.2.9.1.). Полученные данные позволяют предположить, что токсин VarC2 в данных условиях не проявляет шаперонную активность.

Таблица 3.2.9.1. Активность β -галактозидазы после 1 ч инкубации в присутствии VarC2 и DnaK.

Образцы	60 минут
Неденатурированная β -галактозидаза	100 \pm 0%
Денатурированная β -галактозидаза+DnaK+VarC2	2,2 \pm 0,03%
Денатурированная β -галактозидаза+DnaK	2,03 \pm 0,4%
Денатурированная β -галактозидаза +VarC2	1,77 \pm 0,06%
Денатурированная β -галактозидаза	0,18 \pm 0,001%

3.2.10. Определение шаперонной активности белка VarC2 с использованием люциферазы светлячка

Было показано (Таблица 3.2.10.1.), что в присутствии VarC2 и DnaK активность денатурированной люциферазы не изменяется. Таким образом, токсин VarC2 в исследованных нами условиях не участвует в активации шаперонного белка DnaK.

Таблица 3.2.10.1. Активность люциферазы после 1 ч инкубации в присутствии VarC2 и DnaK.

Образцы	60 минут
Неденатурированная люцифераза	100 \pm 0%
Денатурированная люцифераза+DnaK+VarC2	2,92 \pm 1,51%
Денатурированная люцифераза+DnaK	1,19 \pm 0,71%
Денатурированная люцифераза +VarC2	0 \pm 0%
Денатурированная люцифераза	0 \pm 0%

Заключение к разделу 3.2.

VarBC2 (MSMEG_6760-6762) является одной из 8 систем ТА II типа *M. smegmatis* [Zhang et al., 2022]. В литературе содержатся различные данные относительно предполагаемой функции компонентов модуля ТА *varBC2 M. smegmatis*. Антитоксин, наряду с регуляцией транскрипции оперона ТА *varBC2*, может осуществлять активацию экспрессии множества генов, среди которых гены SOS-регулона, гены *dosR*, а также *MSMEG_1275* (кодирует нуклеазу, вносящую двунитевые разрывы в ДНК бактериальной клетки) [Duan et al., 2022]. Токсин VarC2 - рибонуклеаза, его структура была определена в более ранней работе, по результатам которой было сделано предположение о наличии РНКазной активности и возможном участии VarC2 в активации шаперонного белка DnaK [Vajai et al., 2016]. Кроме того, в работе McKenzie (2012) было сформулировано предположение об участии токсина VarC2 в метаболизме глицерина. В работе Zhang (2022) был проведён анализ устойчивости мутанта *M. smegmatis* с делецией всех 8 систем ТА к различным стрессовым факторам, среди которых недостаточное поступление питательных соединений, тепловой и окислительный стресс, а также воздействие изониазида и стрептомицина. По результатам данного исследования было показано, что делеция всех модулей ТА *M. smegmatis* приводит к повышению чувствительности к недостаточному поступлению нутриентов, а также к изменению выживаемости в условиях воздействия стрептомицина, изониазида, окислительного стресса и стресса, связанного с инфицированием бактериофагами [Zhang et al., 2022]. Исследователями также была проведена оценка роли модулей ТА *MSMEG_1278-1277*, *MSMEG_1284-1283*, *MSMEG_3436-3435*, *MSMEG_4448-4447*, *MSMEG_0251-0252* и *MSMEG_5634-5635* в адаптации к вышеописанным стрессовым факторам. В настоящее время данные относительно роли модуля *varBC2* в адаптации *M. smegmatis* к стрессовым воздействиям различной природы в литературе отсутствуют.

С целью определения роли модуля *varBC2* и его отдельных компонентов в адаптации к стрессовым воздействиям различной природы в данной работе впервые были получены штаммы *M. smegmatis* с делецией целого модуля *varBC2*, с делецией и вставкой дополнительной копии генов токсина *varC2* и антитоксина *varB2*. При проведении сравнительного анализа скорости роста полученных штаммов в отсутствие стрессовых воздействий было показано замедление роста у трансформантов *M. smegmatis* с дополнительной копией гена антитоксина. При оценке скорости роста штаммов *M. smegmatis* в среде с минимальным содержанием глицерина было обнаружено замедление роста у штаммов *M. smegmatis* с делецией гена токсина ($\Delta varC2$) и с экспрессией дополнительной копии гена антитоксина ($2*varB2$). Ранее, в работе Duan et al. (2022) было показано, что сверхэкспрессия гена антитоксина *varB2* (в 2-5 раз) приводит к ингибированию роста *M. smegmatis*. Исследователями было выдвинуто предположение, что сверхэкспрессия *varB2* приводит к активации транскрипции нуклеазы *MSMEG_1275*, которая

вносит повреждения в ДНК, накопление которых приводит к гибели бактериальных клеток [Duan et al., 2022]. В настоящей работе также показано, что экспрессия дополнительной копии *varB2* приводит к статистически достоверному замедлению роста, что позволяет предположить сходный механизм, лежащий в основе такого ингибирования.

Оценка лекарственной чувствительности штаммов *M. smegmatis* к эритромицину, офлоксацину, канамицину и рифампицину методом определения МИК показала отсутствие различий между анализируемыми штаммами в величине МИК офлоксацина, канамицина и рифампицина. Вместе с тем было обнаружено, что вставка дополнительной копии гена токсина *varC2* приводит к повышению чувствительности *M. smegmatis* к эритромицину. Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что система TA VarBC2 участвует только в регуляции устойчивости к эритромицину.

Анализ устойчивости к окислительному стрессу, связанному с воздействием 0,5 mM H₂O₂, методом измерения оптической плотности культуры и подсчётом числа КОЕ показал отсутствие различий в степени выживаемости анализируемых штаммов *M. smegmatis*. Таким образом, система TA VarBC2, вероятно, не участвует в регуляции ответа клеток *M. smegmatis* на окислительный стресс, связанный с воздействием H₂O₂.

Биоинформатический анализ предполагаемых взаимодействий компонентов системы TA VarBC2 с другими белками *M. smegmatis* показал отсутствие взаимодействий с другими системами TA. При этом было обнаружено, что токсин VarC2 может взаимодействовать с транскрипционным регулятором семейства TetR – MSMEG_6764. Сравнительный анализ уровня экспрессии гена *MSMEG_6764* в штамме дикого типа и $\Delta varBC2$ показал резкое снижение уровня его транскрипции при делеции модуля *varBC2*. Таким образом, подтверждается участие системы TA VarBC2 в регуляции экспрессии *MSMEG_6764*.

В работе Vajaj (2016) было сформулировано предположение относительно участия гомолога антитоксина Rv2034 в регуляции экспрессии генов регулона DosR *M. tuberculosis*. При анализе транскрипции, проведённом в настоящей работе, было обнаружено, что делеция модуля *varBC2* приводит к резкому снижению уровня экспрессии одного из *dosR*-генов - *MSMEG_3944*. Полученные данные позволяют предположить, что модуль *varBC2* *M. smegmatis*, как и его гомолог у *M. tuberculosis*, может участвовать в регуляции экспрессии генов регулона DosR и, таким образом, участвовать в активации перехода бактериальных клеток в дормантное состояние в условиях стресса.

Оценка рибонуклеазной активности токсина VarC2 показала, что данный токсин обладает рибонуклеазной активностью, что согласуется с предположением Vajaj (2016), о наличии у белка VarC2 рибонуклеазной активности.

В ходе анализа шаперонной активности белка VarC2 было показано, что в исследованных нами условиях VarC2 не участвует в регуляции активности главного шаперонного белка микобактерий – DnaK. Таким образом, предположение Вајај об участии VarC2 в регуляции активности DnaK, сформулированное на основании результатов биоинформатического анализа белка токсина, в настоящей работе доказано не было.

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. 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 биоинформатического анализа трёхмерной структуры VarC46 было обнаружено, 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 и в выживаемости в условиях воздействия окислительного стресса между штаммом *M. smegmatis* дикого типа и штаммами с делециями целого модуля и генов токсина и антитоксина по отдельности. 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 Vajaj (2016).

Кроме того, было показано, что модуль ТА *varBC2* участвует в активации транскрипции одного из генов регулона DosR, играющего ключевую роль в активации 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 *varC46* w.t. *M. tuberculosis* в составе конструкции рKW-MCS-Int+*varC46* w.t. приводит к замедлению скорости роста *M. smegmatis* и снижает чувствительность к эритромицину в 2 раза.
2. Мутация C₁₁₃G в гене токсина *varC46* слабо влияет на его РНКазную активность, но возвращает скорость роста к значениям роста *M. smegmatis* без *varC46* и оставляет устойчивость к эритромицину на уровне *M. smegmatis varC46* w.t., что предполагает его участие в регуляции устойчивости к этому антибиотику.
3. Присутствие гена *varC46* w.t и *varC46* mut в составе конструкции рKW-MCS-Int+*varC46* 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 VarBC2 *M. smegmatis* не участвует в ответе бактериальных клеток на окислительный стресс, обусловленный действием H₂O₂.
5. Отсутствие несвязанного токсина VarC2 приводит к статистически достоверному замедлению роста *M. smegmatis* при переходе в стационарную фазу.
6. Отсутствие свободного антитоксина VarB2 приводит к ингибированию экспрессии *MSMEG_6764 (tetR)* и *MSMEG_3944 (dosR)*.
7. Токсин VarC2 *M. smegmatis* обладает рибонуклеазной активностью и не влияет на активность шаперонного белка DnaK.

Список сокращений

ТА – токсин-антитоксин

VarC (от virulence associated protein) – данное семейство систем ТА II типа получило название в связи с тем, что первый модуль ТА был открыт на плазмиде *Salmonella dublin* с генами вирулентности.

ДМСО – диметилсульфоксид

PIN-домен (PilT N terminus) – обширное семейство нуклеаз, обладающих сходством с N-концевым доменом аннотированного белка биогенеза пилей (PilT).

АФК – активные формы кислорода

АФА – активные формы азота

OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase) – ростовая добавка для микобактерий, содержащая олеиновую кислоту, бычий альбумин, декстрозу и каталазу.

IPTG - Изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)

ТАЕ - трис-ацетатный буфер

PSA - пероксодисульфат аммония

SDS - лаурилсульфат натрия

PMSF - фенилметилсульфонилфторид

TEMED - тетраметилэтилендиамин

ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-galactoside) - орто-нитрофенил-βD-галактопиранозид (ОНФГ)

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

BSA (Bovine serum albumin) – бычий сывороточный альбумин (БСА)

ANOVA (analysis of variance) – дисперсионный анализ используется для оценки статистической значимости различий между сравниваемыми группами.

KOE – колониобразующие единицы

НАД - никотинамиддинуклеотид

Список терминов

Антибиотикотолерантность - способность бактериальных клеток выживать в присутствии высоких концентраций антибиотиков различных классов с утратой способности к делениям, в отличие от устойчивости не наследуется.

Биоплёнки – клеточный конгломерат (сообщество), расположенное на биотических либо на абиотических поверхностях, отдельные клетки которого прикреплены друг к другу и погружены в выделяемый ими матрикс

Вирулентность – это количественная характеристика, определяемая минимальным числом патогенных клеток, которое необходимо для заражения организма-хозяина.

Геномные острова – участки бактериального генома, способные к горизонтальному переносу и содержащие гены, которые обеспечивают селективное преимущество.

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – для штаммов *M. tuberculosis* со множественной лекарственной устойчивостью характерно наличие устойчивости как минимум к двум основным противотуберкулезным препаратам первой линии - рифампицину и изониазиду.

Персистенция – представляет собой эффективную эволюционную стратегию выживания бактериальных клеток в условиях воздействия неблагоприятных факторов среды за счёт перехода в метаболически неактивное (дормантное) состояние, в котором бактериальные клетки становятся невосприимчивыми (толерантными) к воздействию стрессовых факторов.

Стресс-адаптивная функция систем ТА - участие систем ТА в адаптации и выживании бактериальных клеток в условиях воздействия стрессовых факторов различной природы.

Широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) – для штаммов *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью характерна устойчивость к рифампицину, изониазиду, любому антибиотику из класса фторхинолонов (офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин или гатифлоксацин) и, по крайней мере, к одному инъекционному противотуберкулезному препарату второй линии (канамицин, амикацин, капреомицин).

Список литературы

1. Демидёнок О. И., Гончаренко А. В. Системы токсин–антитоксин бактерий и перспективы их использования в медицине (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. - 2013. - том 49. - № 6. - с. 539–546. doi: 10.7868/S055510991306007X.
2. Шур К. В. Изучение роли гена *whib7* и генов его регулона в природной устойчивости к антибиотикам у микобактерий// Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 1.5.7: защищена 25.05.2017. – М., 2017. - 187 с.
3. Aakre C. D, Phung T. N, Huang D, Laub M. T. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp // Mol. Cell. – 2013. – 52. - Pp. 617–628. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.014.
4. Agarwal S., Tiwari P., Deep A., et al. System-wide analysis unravels the differential regulation and in vivo essentiality of virulence-associated proteins B and C toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Infect. Dis. – 2018. - 217(11). – Pp. 1809-1820. doi: 10.1093/infdis/jiy109.
5. Alawneh A. M., Qi D., Yonesaki T., et al. An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module // Mol. Microbiol. – 2016. - 99(1). – Pp. 188-198. doi: 10.1111/mmi.13225.
6. Alderwick L. J., Harrison J., Lloyd J. S., et al. The mycobacterial cell wall - peptidoglycan and arabinogalactan // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2015. - 5(8):a021113. - Pp. 1-15. doi: 10.1101/cshperspect.a021113.
7. Aldsworth T. G., Sharman R. L., Dodd C. E. R. Bacterial suicide through stress // Cell Mol. Life Sci. – 1999. - 56(5-6). – Pp. 378-383. doi: 10.1007/s000180050439.
8. Anders K. Resolution of Students t-tests, ANOVA and analysis of variance components from intermediary data // Biochem. Med. (Zagreb). – 2017. - 27(2). – Pp. 253–258. doi: 10.11613/BM.2017.026.
9. Averina O., Alekseeva M., Shkoporov A., Danilenko V. Functional analysis of the type II toxin-antitoxin systems of the MazEF and RelBE families in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 // Anaerobe. – 2015. - 35(Pt B). – Pp. 59-67. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.07.007.
10. Bajaj R. A., M.A. Arbing, Shin A. et al. 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 Cryst. – 2016. - F72. - Pp. 863-869. doi: 10.1107/S2053230X16017957.

11. Baldwin T.O., Ziegler M.M., Chaffotte A. F., Goldberg M.E. Contribution of folding steps involving the individual subunits of bacterial luciferase to the assembly of the active heterodimeric enzyme // *J. Biol. Chem.* – 1993. – 268(15). - Pp. 10766-10772.
12. Barth V. C., Chauhan U., Zeng J., et al. *Mycobacterium tuberculosis* VapC4 toxin engages small ORFs to initiate an integrated oxidative and copper stress response // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2021. - 118(32):e2022136118. doi: 10.1073/pnas.2022136118.
13. Baykan A. H., Sayiner H. S., Aydin E., et al. Extrapulmonary tuberculosis: an old but resurgent problem // *Insights into Imaging.* – 2022. – 13. – 39. doi: 10.1186/s13244-022-01172-0.
14. Baysarowich J., Koteva K., Hughes D. W., et al. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: structure and diversity of Arr // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – 105. - Pp. 4886–4891. doi: 10.1073/pnas.0711939105.
15. Beck I.N., Usher B., Hampton H. G., et al. Antitoxin autoregulation of *M. tuberculosis* toxin-antitoxin expression through negative cooperativity arising from multiple inverted repeat sequences // *Biochem J.* – 2020. - 477(12). – Pp. 2401-2419. doi: 10.1042/BCJ20200368.
16. Bendl J., Stourac J., Salanda O., et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations // *PLoS Comput. Biol.* – 2014. - 10(1):e1003440. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003440.
17. Berkvens A., Chauhan P., Bruggeman F. J. Integrative biology of persister cell formation: molecular circuitry, phenotypic diversification and fitness effects // *J. R. Soc. Interface.* – 2022. - 19(194):20220129. – Pp. 1-12. doi: 10.1098/rsif.2022.0129.
18. Berney M., Greening C., Conrad R., et al. An obligately aerobic soil bacterium activates fermentative hydrogen production to survive reductive stress during hypoxia // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2014. - 111(31). – Pp. 11479–11484. doi: 10.1073/pnas.1407034111.
19. Berney M., Berney-Meyer L., Wong K.-W., et al. Essential roles of methionine and s-adenosylmethionine in the autarkic lifestyle of *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. - 112. – Pp. 10008–10013. doi: 10.1073/pnas.1513033112.
20. Berrow N. S., Büssow K., Coutard B., et al. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2006. -62(10). – Pp. 1218-1226. doi: 10.1107/S0907444906031337.
21. Bespyatykh J., Smolyakov A., Guliaev A., et al. Proteogenomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster strains // *J. Proteomics.* – 2019. – 192. – Pp. 18-26. doi: 10.1016/j.jprot.2018.07.002.

22. Bespyatykh J., Shitikov E., Guliaev A., et al. System OMICs analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster // *Sci. Rep.* – 2019. - 9(1):19255. – Pp. 1-11. doi: 10.1038/s41598-019-55896-z.
23. Blower T. R, Short F. L, Rao F., et al. Identification and classification of bacterial type III toxin–antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – 40. - Pp. 6158–6173. doi: 10.1093/nar/gks231.
24. Boldrin F., Provvedi R., Mazzabo L. C., et al. Tolerance and persistence to drugs: a main challenge in the fight against *Mycobacterium tuberculosis* // *Front. Microbiol.* 2020, 11:1924, Pp. 1-11, doi: 10.3389/fmicb.2020.01924;
25. Bollen C., Dewachter L., Michiels J. Protein aggregation as a bacterial strategy to survive antibiotic treatment // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. - 8:669664. doi: 10.3389/fmolb.2021.669664.
26. Bordes P., Sala A. J., Ayala S., et al. Chaperone addiction of toxin–antitoxin systems // *Nat. Commun.* - 2016. - 7: 13339. doi: 10.1038/ncomms13339.
27. Bordes P., Genevaux P. Control of toxin-antitoxin systems by proteases in *Mycobacterium tuberculosis* // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. – 8(691399). doi: 10.3389/fmolb.2021.691399.
28. Brudey K., Driscoll J. R., Rigouts L. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // *BMC Microbiol.* – 2006. – 6(23). – Pp. 1-17. doi: 10.1186/1471-2180-6-23.
29. Cai Y., Usher B., Gutierrez C., et al. A nucleotidyltransferase toxin inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* through inactivation of tRNA acceptor stems // *Sci. Adv.* – 2020. - 6(31):eabb6651. doi: 10.1126/sciadv.abb6651.
30. Capozzi V., Fiocco D., Amodio M. L., et al. Bacterial stressors in minimally processed food // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – 10. – Pp. 3076-3105. doi:10.3390/ijms10073076.
31. Chan W. T., Balsa D., Espinosa M. One cannot rule them all: Are bacterial toxins-antitoxins druggable? // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2015. - 39(4). – Pp. 522-540. doi: 10.1093/femsre/fuv002.
32. Chan W. T., Espinosa M., Yeo C. C. Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems // *Front. Mol. Biosci.* – 2016. - 3:9. - Pp. 1-20. doi: 10.3389/fmolb.2016.00009.
33. Chan W. T., Domenech M., Moreno-Córdoba I., et al. The *Streptococcus pneumoniae* yefM-yoeB and relBE toxin-antitoxin operons participate in oxidative stress and biofilm formation // *Toxins (Basel).* – 2018. - 10(9):378. doi: 10.3390/toxins10090378.

34. Chandra P., Grigsby S. J., Philips J. A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis* // Nat. Rev. Microbiol. – 2022. - 20(12). – Pp. 750–766. doi: 10.1038/s41579-022-00763-4.
35. Chattopadhyay G., Bhasin M., Ahmed S., et al. Functional and biochemical characterization of the MazEF6 toxin-antitoxin system of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Bacteriol. – 2022. - 204(4):e0005822. doi: 10.1128/jb.00058-22.
36. Chauhan U., Barth V. C., Woychik N. A. tRNA^{fMet} inactivating *Mycobacterium tuberculosis* VapBC toxin-antitoxin systems as therapeutic targets // Antimicrob. Agents Chemother. – 2022. - 66(5):e0189621. doi: 10.1128/aac.01896-21.
37. Choi J. S., Kim W., Suk S., et al. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli* // RNA Biol. – 2018. - 15(10). - Pp. 1319-1335. doi: 10.1080/15476286.2018.1532252.
38. Chono H., Saito N., Tsuda H., et al. *In vivo* safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4⁺ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model // PLoS One. – 2011. - 6(8): e23585. doi: 10.1371/journal.pone.0023585.
39. Coll F., McNerney R., Guerra-Assunção J. A. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // Nat Commun. – 2014. - 5(4812). – Pp. 1-5. doi: 10.1038/ncomms5812.
40. Coray D. S., Wheeler N. E., Heinemann J. A., et al. Why so narrow: distribution of anti-sense regulated, type I toxin-antitoxin systems compared with type II and type III systems // RNA Biol. – 2017. - 14(3). - Pp. 275–280. doi: 10.1080/15476286.2016.1272747.
41. Coussens N.P., Daines D.A. Wake me when it's over - Bacterial toxin-antitoxin proteins and induced dormancy // Exp. Biol. Med (Maywood). – 2016. - 241(12). – Pp. 1332-1342. doi: 10.1177/1535370216651938.
42. Davis B. D., Mingioli E. S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12 // J. Bacteriol. – 1950. - 60(1). – Pp. 17-28. doi: 10.1128/jb.60.1.17-28.1950.
43. Dawan J., Ahn J. Bacterial stress responses as potential targets in overcoming antibiotic resistance // Microorganisms. - 2022. - 10(7). - 1385. doi: 10.3390/microorganisms10071385.
44. Deep A., Tiwari P., Agarwal S., et al. Structural, functional and biological insights into the role of *Mycobacterium tuberculosis* VapBC11 toxin-antitoxin system: targeting a tRNase to tackle mycobacterial adaptation // Nucleic Acids Res. – 2018. - 46(21). – Pp. 11639–11655. doi: 10.1093/nar/gky924.

45. Deter H. S., Jensen R. V., Mather W. H., et al. Mechanisms for differential protein production in toxin-antitoxin systems // *Toxins (Basel)*. – 2017. - 9(7):211. - Pp. 1-13. doi: 10.3390/toxins9070211.
46. Dewachter L., Fauvart M., Michiels J. Bacterial heterogeneity and antibiotic survival: understanding and combatting persistence and heteroresistance // *Mol. Cell*. – 2019. - 76(2). – Pp. 255-267. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.028.
47. Diaz-Orejas R., Espinosa M., Yeo C. C. The importance of the expendable: toxin–antitoxin genes in plasmids and chromosomes // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. - 8(1479). - Pp. 1-7. doi: 10.3389/fmicb.2017.01479.
48. Domenech P., Zou J., Averbach A., et al. Unique regulation of the *dosR* regulon in the Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Bacteriol.* – 2016. - 199(2):e00696-16. doi: 10.1128/JB.00696-16.
49. Do Vale A., Cabanes D., Sousa S. Bacterial toxins as pathogen weapons against phagocytes // *Front. Microbiol.* – 2016. - 7(42). doi: 10.3389/fmicb.2016.00042.
50. Duan X., Huang X., Xu J., et al. ArsR Family Regulator MSMEG_6762 Mediates the programmed cell death by regulating the expression of HNH nuclease in *Mycobacteria* // *Microorganisms*. – 2022. - 10(8):1535. doi: 10.3390/microorganisms10081535.
51. Du H. S., Wang W., Ye L., et al. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction // *Nature Protocols*. – 2021. – 16. – Pp. 5634-5651. doi:10.1038/s41596-021-00628-9.
52. Eisenreich W., Heesemann J., Rudel T., Goebel W. Metabolic host responses to infection by intracellular bacterial pathogens // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2013. - 3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00024.
53. Elharar Y., Roth Z., Hermelin I., et al. Survival of mycobacteria depends on proteasome-mediated amino acid recycling under nutrient limitation // *The EMBO Journal*. – 2014. -33(16). – Pp. 1802-1814. doi: 10.15252/embj.201387076.
54. Eroshenko D. V., Polyudova T. V., Pyankova A. A. VapBC and MazEF toxin/antitoxin systems in the regulation of biofilm formation and antibiotic tolerance in nontuberculous mycobacteria // *Int. J. Mycobacteriol.* – 2020. - 9(2). – Pp. 156-166. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_61_20.
55. Eun H. J., Lee J., Kang S. J., Lee B. J. The structural and functional investigation of the VapBC43 complex from *Mycobacterium tuberculosis* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2022. – 616. – Pp.19-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.05.061.

56. Fay A., Glickman M. S. An essential nonredundant role for mycobacterial DnaK in native protein folding // PLoS Genet. – 2014. – 10(7):e1004516. doi: 10.1371/journal.pgen.1004516.
57. Fay A., Philip J., Saha P., et al. The DnaK chaperone system buffers the fitness cost of antibiotic resistance mutations in Mycobacteria // mBio. – 2021. – 12(2):e00123-21. doi: 10.1128/mBio.00123-21.
58. Feng L., Chen S., Hu Y. PhoPR positively regulates whiB3 expression in response to low pH in pathogenic mycobacteria // J. Bacteriol. – 2018. – 200.- e00766–17. doi: 10.1128/JB.00766-17
59. Forrellad M. A., Klepp L. I., Gioffré A., et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // Virulence. – 2013. – 4(1). – Pp. 3-66. doi: 10.4161/viru.22329.
60. Fraikin N., Goormaghtigh F., Melderens L. V. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions // J. Bacteriol. – 2020. – 202(7):e00763-19. – Pp. 1-14. doi: 10.1128/JB.00763-19.
61. Frampton R., Aggio R. B. M., S. G. Villas-Boas et al. Toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium smegmatis* are essential for cell survival // Journal of biological chemistry. – 2012. – 287(8). – Pp. 5340-5356. doi: 10.1074/jbc.M111.286856.
62. Freire D. M., Gutierrez C., Garza-Garcia A. An NAD⁺ phosphorylase toxin triggers *Mycobacterium tuberculosis* cell death // Mol. Cell. – 2019. – 73(6). – Pp. 1282-1291. doi: 10.1016/j.molcel.2019.01.028.
63. Freschi L., Vargas R. J., Husain A., et al. Population structure, biogeography and transmissibility of *Mycobacterium tuberculosis* // Nat. Commun. – 2021. – 12(1):6099. – Pp. 1-11. doi: 10.1038/s41467-021-26248-1.
64. Gagneux S., DeRiemer K., Van T. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2006. – 103(8). – Pp. 2869-2873. doi: 10.1073/pnas.0511240103.
65. Gao C., Yang M., He Z. G. Characterization of a novel ArsR-like regulator encoded by Rv2034 in *Mycobacterium tuberculosis* // PLoS One. – 2012. – 7(4):e36255. doi: 10.1371/journal.pone.0036255.
66. Garforth S. J., Patel D., Feng M., et al. Unusually wide co-factor tolerance in a metalloenzyme; divalent metal ions modulate endo-exonuclease activity in T5 exonuclease // Nucleic Acids Res. – 2001. – 29(13). – Pp. 2772-2779. doi: 10.1093/nar/29.13.2772.

67. Genest O., Hoskins J.R., Camberg J. L., et al. Heat shock protein 90 from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling // PNAS. – 2011. – 108(20). - Pp. 8206–8211. doi: 10.1073/pnas.1104703108.
68. Georgiades K., Raoult D. Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules // PLoS One. – 2011. - 6(3):e17962. doi: 10.1371/journal.pone.0017962.
69. Germain E., Castro-Roa D., Zenkin N., Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA // Mol. Cell. – 2013. – 52. - Pp. 248–254. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.045.
70. Goeders N., Melderen L. V. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems // Toxins (Basel). – 2014. - 6(1). – Pp.304-24. doi: 10.3390/toxins6010304.
71. Goossens S. N., Sampson S. L., Rie A. V. Mechanisms of drug-induced tolerance in *Mycobacterium tuberculosis* // Clin. Microbiol. Rev. – 2021. - 34(1): e00141-20. - Pp 1-21. doi: 10.1128/CMR.00141-20.
72. Guillet V., Bordes P., Bon C., et al. Structural insights into chaperone addiction of toxin-antitoxin systems // Nat. Commun. -2019. - 10: 782. doi: 10.1038/s41467-019-08747-4.
73. Gupta A., Venkataraman B., Vasudevan M. Co-expression network analysis of toxin-antitoxin loci in *Mycobacterium tuberculosis* reveals key modulators of cellular stress // Scientific Reports. – 2017. – Pp. 1-14. doi: 10.1038/s41598-017-06003-7.
74. Haimes J., Kelley M. Demonstration of a $\Delta\Delta C_q$ calculation method to compute relative gene expression from qPCR data. A Horizon Discovery Group Company, USA, 2018. – Pp. 1-4.
75. Han Y., Lee E. J. Substrate specificity of bacterial endoribonuclease toxins // BMB Rep. - 2020. - 53(12). - Pp. 611–621. doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.12.203.
76. Harms A., Brodersen D. E., Mitarai N., Gerdes K. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology // Mol. Cell. – 2018. – 70. - Pp. 768–784. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.003.
77. Harnagel A., Quezada L. L., Park S. W., et al. Nonredundant functions of *Mycobacterium tuberculosis* chaperones promote survival under stress // Mol. Microbiol. – 2021. - 115(2). – Pp. 272-289. doi: 10.1111/mmi.14615.
78. Hasenoehrl E. J., Sajorda D. R., Berney-Meyer L., et al. Derailing the aspartate pathway of *Mycobacterium tuberculosis* to eradicate persistent infection // Nat. Commun. – 2019. – 10. – Pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-019-12224-3.

79. Hayes F., Kedzierska B. Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs // *Toxins*. – 2014. – 6. – Pp. 337-358. doi: 10.3390/toxins6010337.
80. Hondalus M. K., Bardarov S., Russell R., et al. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* – 2000. – 68. – Pp. 2888–2898. doi: 10.1128/iai.68.5.2888-2898.2000.
81. Huang L., Nazarova E. V., Russell D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: Bacterial fitness within the host macrophage // *Microbiol. Spectr.* – 2019. – 7(2), Pp. 1-18. doi:10.1128/microbiolspec.
82. Hudock T. A., Foreman T. W., Bandyopadhyay N., et al. Hypoxia sensing and persistence genes are expressed during the intragranulomatous survival of *Mycobacterium tuberculosis* // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2017. – 56(5). – Pp. 637-647. doi: 10.1165/rcmb.2016-0239OC.
83. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. – 1990. – 96(1). – Pp. 23-28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.
84. Jiang Z., Zhuang Z., Mi K. Experimental evolution reveals redox state modulates *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity // *Front. Genet.* – 2022. – 13(758304). – Pp. 1-13. doi: 10.3389/fgene.2022.758304.
85. Jin G., Pavelka Jr. M.S., Butler J. S. Structure-function analysis of VapB4 antitoxin identifies critical features of a minimal VapC4 toxin-binding module // *J. Bacteriol.* – 2015. – 197(7). – Pp. 1197-207. doi: 10.1128/JB.02508-14.
86. Juhas M., Meer J. R., Gaillard M., et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2009. – 33(2). – Pp. 376-393. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
87. Jurėnas D., Melderėn L. V. The variety in the common theme of translation inhibition by type II toxin-antitoxin systems // *Front. Genet.* – 2020. – 11(262). doi: 10.3389/fgene.2020.00262.
88. Kamruzzaman M., Wu A.Y., Iredell J. L. Biological functions of type II toxin-antitoxin systems in bacteria // *Microorganisms*. – 2021. – 9(6):1276. – Pp. 1-23. doi: 10.3390/microorganisms9061276.
89. Kang S. M., Kim D. H., Lee K. Y., et al. Functional details of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC26 toxin-antitoxin system based on a structural study: insights into unique binding and antibiotic peptides // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – 45(14). – Pp. 8564–8580. doi: 10.1093/nar/gkx489.

90. Kang S. M., Kim D. H., Jin C., et al. A systematic overview of type II and III toxin-antitoxin systems with a focus on druggability // *Toxins (Basel)*. – 2018. - 10(12):515. - Pp. 1-21. doi: 10.3390/toxins10120515.
91. Kang S. M. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0229c shows ribonuclease activity and reveals its corresponding role as toxin VapC51 // *Antibiotics (Basel)*. – 2023. - 12(5): 840. – Pp. 1-9. doi: 10.3390/antibiotics12050840.
92. Karimi S., Ghafourian S., Kalani M. T., et al. Association between toxin-antitoxin systems and biofilm formation // *Jundishapur. J. Microbiol.* – 2014. - 8(1):e14540. – Pp. 1-6. doi: 10.5812/jjm.14540.
93. Katikaridis P., Bohl V., Mogk A. Resisting the heat: bacterial disaggregases rescue cells from devastating protein aggregation // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. - 8:681439. – Pp. 1-14. doi: 10.3389/fmolb.2021.681439.
94. Keren I., Minami S., Rubin E. et al. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters // *mBio*. – 2011. - 14;2(3):e00100-11. – Pp. 1-10. doi: 10.1128/mBio.00100-11.
95. Kim Y., Choi E., Hwang J. Functional studies of five toxin-antitoxin modules in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // *Front. Microbiol.* – 2016. – 7(2071). – Pp. 1-14. doi: 10.3389/fmicb.2016.02071.
96. Kleber-Janke T., Becker W. M. Use of modified BL21 (DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage // *Protein Expr. Purif.* – 2000. - 19(3). – Pp. 419-24. doi: 10.1006/prep.2000.1265.
97. Klimina K. M, Poluektova E. U, Danilenko V. N. Bacterial toxin–antitoxin systems: properties, functional significance, and possibility of use // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2017. – 53. - Pp. 494–505. doi: 10.1134/S0003683817050076.
98. Klimina K. M., Voroshilova V.N., Poluektova E.U. et al. Toxin-antitoxin systems: a tool for taxonomic analysis of human intestinal microbiota // *Toxins (Basel)*. – 2020. -12(6). – Pp. 388:1-388:14. doi: 10.3390/toxins12060388
99. Kudryavtseva S. S., Pichkur E. B., Yaroshevich I. A., et al. Novel cryo-EM structure of an ADP-bound GroEL-GroES complex // *Sci. Rep.* – 2021. - 11(1):18241. – Pp. 1-9. doi: 10.1038/s41598-021-97657-x.
100. Kundu M., Basu J. Applications of transcriptomics and proteomics for understanding dormancy and resuscitation in *Mycobacterium tuberculosis* // *Front. Microbiol.* – 2021. – 12 (642487). – Pp. 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2021.642487.

101. Lecomte S. N., Fermon L., Felden B., et al. Bacterial type I toxins: folding and membrane interactions // *Toxins* (Basel). – 2021. - 13(7):490. - Pp. 1-19. doi: 10.3390/toxins13070490.
102. Lee I. G., Lee S. J., Chae S., et al. Structural and functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC30 toxin-antitoxin system: implications for the design of novel antimicrobial peptides // *Nucleic Acids Res.* – 2015. - 43(15). – Pp. 7624–7637. doi: 10.1093/nar/gkv689.
103. Lee K. U., Lee B. J. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria // *Toxins* (Basel). – 2016. - 8(10):305. - Pp. 1-33. doi: 10.3390/toxins8100305.
104. LeRoux M., Culviner P. H., Liu Y. J. Stress can induce the transcription of toxin-antitoxin systems without activating toxin // *Mol. Cell.* – 2020. - 79(2). – Pp.280–292. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.028.
105. Li G. W., Burkhardt D., Gross C., Weissman J. S. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources // *Cell.* – 2014. - 157(3). – Pp. 624-635. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.033.
106. Li X., Tao J., Han J. The gain of hydrogen peroxide resistance benefits growth fitness in mycobacteria under stress // *Protein Cell.* – 2014. - 5(3). – Pp. 182–185. doi: 10.1007/s13238-014-0024-5.
107. Lima-Mendez G., Alvarenga D. O., Ross K. Toxin-antitoxin gene pairs found in Tn3 family transposons appear to be an integral part of the transposition module // *mBio.* - 2020. - 11(2):e00452-20. – Pp. 1-19. doi: 10.1128/mBio.00452-20.
108. Lobato-Márquez D., Díaz-Orejas R., García-Del Portillo F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2016. - 40(5). – Pp. 592-609. doi: 10.1093/femsre/fuw022.
109. Lu Z., Wang H., Zhang A., Tan Y. The VapBC1 toxin-antitoxin complex from *Mycobacterium tuberculosis*: purification, crystallization and X-ray diffraction analysis // *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* – 2016. - 72(6). – Pp. 485-489. doi: 10.1107/S2053230X16007603.
110. Mansour M., Giudice E., Xu X., et al. Substrate recognition and cryo-EM structure of the ribosome-bound TAC toxin of *Mycobacterium tuberculosis* // *Nat. Commun.* – 2022. - 13(1):2641. – Pp. 1-14. doi: 10.1038/s41467-022-30373-w.
111. Marianovsky I., Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G. The regulation of the *Escherichia coli mazEF* promoter involves an unusual alternating palindrome // *J. Biol. Chem.* – 2001. - 276(8). – Pp. 5975-5984. doi: 10.1074/jbc.M008832200.

112. Marimon O, Teixeira J. M, Cordeiro T. N, et al. An oxygen-sensitive toxin–antitoxin system // *Nat. Commun.* – 2016. - 7:13634. - Pp. 1-10. doi: 10.1038/ncomms13634.
113. Masuda H, Inouye M. Toxins of prokaryotic toxin-antitoxin systems with sequence-specific endoribonuclease activity // *Toxins.* – 2017. - 9(4):140. - Pp. 1-23. doi: 10.3390/toxins9040140.
114. Matelska D., Steczkiewicz K., Ginalski K. Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily // *Nucleic Acids Res.* – 2017. - 45(12). – Pp. 6995–7020. doi: 10.1093/nar/gkx494.
115. Mayer C., Takiff H. The molecular genetics of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiol. Spectr.* – 2014. - 2(4). - Pp. 1-22. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0009-2013.
116. McKenzie J. L., Robson J., Berney M., et al. A VapBC toxin-antitoxin module is a posttranscriptional regulator of metabolic flux in mycobacteria // *J. Bacteriol.* – 2012. - 194(9). – Pp. 2189-204. doi: 10.1128/JB.06790-11.
117. Methot P.O., Alizon S. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions // *Virulence.* – 2014. - 5(8). – Pp. 775-785. doi: 10.4161/21505594.2014.960726.2014.
118. Miallau L., Faller M., Chiang J., et al. Structure and proposed activity of a member of the VapBC family of toxin-antitoxin systems // *J. Biol. Chem.* – 2009. - 284(1). - Pp. 276–283. doi: 10.1074/jbc.M805061200.
119. Michiels J. E., Bergh B. V., Verstraeten N., Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence // *Drug Resist. Updat.* – 2016. – 29. – Pp. 76-89. doi: 10.1016/j.drug.2016.10.002.
120. Mikhecheva N.E., Zaychikova M.V., Melerzanov A.V., Danilenko V.N. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages // *Genome Biol. Evol.* – 2017. - 9(4). - Pp. 887–899. doi: 10.1093/gbe/evx053.
121. Mokrousov I., Pasechnik O., Vyazovaya A., et al. Impact of pathobiological diversity of *Mycobacterium tuberculosis* on clinical features and lethal outcome of tuberculosis // *BMC Microbiol.* – 2022. - 22(1):50. – Pp. 1-10. doi: 10.1186/s12866-022-02461-w.
122. Moyed H. S., Bertrand K. P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis // *J. Bacteriol.* - 1983. - 155(2). – Pp. 768-775. doi: 10.1128/jb.155.2.768-775.1983.

123. Mruk I., Kobayashi I. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems // *Nucleic Acids Res.* – 2014. - 42(1). - Pp. 70-86. doi: 10.1093/nar/gkt711.
124. Nasiri M. J., Darban-Sarokhalil D., Fooladi A. A., Feizabadi M. M. katG Ser315 and rpoB 81-bp hotspot region substitutions: reliability for detection of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* – 2016(5) - Pp. 92–93. doi: 10.1016/j.jgar.2015.12.001.
125. Page R., Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence // *Nat. Chem. Biol.* – 2016. - 12(4). – Pp. 208-214. doi: 10.1038/nchembio.2044.
126. Parbhoo T., Mouton J. M., Sampson S. L. Phenotypic adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to host-associated stressors that induce persister formation // *Front. Cell Infect. Microbiol.* – 2022. – 12(956607). – Pp. 1-19. doi: 10.3389/fcimb.2022.956607.
127. Parish T., Smith D. A., Kendall S., et al. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* – 2003. - 71(3). – Pp. 1134-1140. doi: 10.1128/IAI.71.3.1134-1140.2003.
128. Parish T., Brown A.C. *Mycobacteria protocols. Methods in Molecular Biology.* New York: Humana Press, 2009, 456 p
129. Park J. H., Yamaguchi Y., Inouye M. Intramolecular regulation of the sequence-specific mRNA interferase activity of MazF fused to a MazE fragment with a linker cleavable by specific proteases // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. - 78(11). – Pp. 3794-3799. doi: 10.1128/AEM.00364-12.
130. Paul P., Sahu B. R., Suar M. Plausible role of bacterial toxin-antitoxin system in persister cell formation and elimination // *Mol. Oral. Microbiol.* – 2019. - 34(3). – Pp. 97-107. doi: 10.1111/omi.12258.
131. Pavelka M. S., Chen B., Kelley C. L., et al. Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* – 2003. – 71. – Pp. 4190–4192. doi: 10.1128/IAI.71.7.4190-4192.2003.
132. Peltier J., Hamiot A., Garneau J. R., et al. Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile* // *Commun. Biol.* - 2020. - 3(1):718. - Pp. 1-13. doi: 10.1038/s42003-020-01448-5.
133. Pu Y., Li Y., Jin X., et al. ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance // *Mol. Cell.* – 2019. - 73(1). – Pp. 143-156.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.022.

134. Rahlwes K. C., Dias B. R. S., Campos P.C., et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // Virulence. – 2023. - 14(1). – Pp. 1-29. doi: 10.1080/21505594.2022.2150449.
135. Ramage H. R., Connolly L. E., Cox J. S. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution // PLoS Genet. – 2009. - 5(12):e1000767. – Pp. 1-14. doi: 10.1371/journal.pgen.1000767.
136. Ramisetty B. C. M. Regulation of type II toxin-antitoxin systems: the translation-responsive model // Front. Microbiol. – 2020. - 11:895. – Pp. 1-6. doi: 10.3389/fmicb.2020.00895.
137. Rizvi A., Yousf S., Balakrishnan K. Metabolomics studies to decipher stress responses in *Mycobacterium smegmatis* point to a putative pathway of methylated amine biosynthesis // J. Bacteriol. – 2019. - 201(15): e00707-18. – Pp. 1-12. doi: 10.1128/JB.00707-18.
138. Robichon C., Luo J., Causey T. B., et al. Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography // Appl. Environ. Microbiol. -2011. - 77(13). – Pp. 4634-4646. doi: 10.1128/AEM.00119-11.
139. Ronneau S., Helaine S. Clarifying the link between toxin-antitoxin modules and bacterial persistence // J. Mol. Biol. – 2019. - 431(18). – Pp. 3462-3471. doi: 10.1016/j.jmb.2019.03.019.
140. Rosenzweig R., Sekhar A., Nagesh J., Kay L. E. Promiscuous binding by Hsp70 results in conformational heterogeneity and fuzzy chaperone-substrate ensembles // eLife. – 2017. - 6(e28030). – Pp. 1-22 doi: 10.7554/eLife.28030.
141. Równicki M., Lasek R., Trylska J., Bartosik D. Targeting type II toxin-antitoxin systems as antibacterial strategies // Toxins (Basel). – 2020. - 12(9):568. – Pp. 1-16. doi: 10.3390/toxins12090568.
142. Roy M., Kundu A., Bhunia A., et al. Structural characterization of VapB46 antitoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: insights into VapB46-DNA binding // FEBS J. – 2019. - 286(6). – Pp. 1174-1190. doi: 10.1111/febs.14737.
143. Roy M., Bose M., Bankoti K. et al. Biochemical characterization of VapC46 toxin from *Mycobacterium tuberculosis* // Molecular Biotechnology. - 2020. - 62(6-7). – Pp. 335-343. doi: 10.1007/s12033-020-00253-z.
144. Sabate R., de Groot N. S., Ventura S. Protein folding and aggregation in bacteria // Cell Mol. Life Sci. – 2010. - 67(16). – Pp. 2695-2715. doi: 10.1007/s00018-010-0344-4.

145. Saini V., Cumming B. M., Guidry L., et al. Ergothioneine maintains redox and bioenergetic homeostasis essential for drug susceptibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // Cell Rep. 2016. – 14. – Pp. 572–585. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.056.
146. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press. - 1989. NY. – Pp. 931–957 c.
147. Sala A., Bordes P., Genevoux P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis* // Toxins. – 2014. – 6. - Pp. 1002-1020. doi: 10.3390/toxins6031002.
148. Sarpong D. D., Murphy E. R. RNA regulated toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria // Front. Cell Infect. Microbiol. – 2021. - 11:661026. - Pp. 1-17. doi: 10.3389/fcimb.2021.661026.
149. Schramm F. D., Schroeder K., Jonas K. Protein aggregation in bacteria // FEMS Microbiol. Rev. – 2020. - 44(1). – Pp. 54-72. doi: 10.1093/femsre/fuz026.
150. Sevalkar R. R., Arora D., Singh P. R., et al. Functioning of mycobacterial heat shock repressors requires the master virulence regulator PhoP // J. Bacteriol. – 2019. – 201(e00013–19). – Pp. 1-16. doi: 10.1128/JB.00013-19.
151. Shapira A., Shapira S., Gal-Tanamy M., et al. Removal of hepatitis C virus-infected cells by a zymogenized bacterial toxin // PLoS One. – 2012. - 7(2):e32320. – Pp. 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0032320.
152. Sharma A., Chattopadhyay G., Chopra P., et al. VapC21 toxin contributes to drug-tolerance and interacts with non-cognate VapB32 antitoxin in *Mycobacterium tuberculosis* // Front. Microbiol. – 2020. – 11(2037). – Pp. 1-17. doi: 10.3389/fmicb.2020.02037.
153. Sharrock A., Ruthe A., Andrews E. S. V., et al. VapC proteins from *Mycobacterium tuberculosis* share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity // PLoS One. – 2018. - 13(8): e0203412. – Pp. 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0203412.
154. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., et al. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* // Sci. Rep. – 2017. - 7(1):9227. – Pp. 1-10. doi: 10.1038/s41598-017-10018-5.
155. Shroder H., Langer T., Hartl F. U., Bukau B. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage // The EMBO J. - 1993. – 12(11). - Pp. 4137 – 4144. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb06097.x.
156. Shur K. V., Zaychikova M. V., Mikhecheva N. E., et al. Draft genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain B9741 of Beijing B0/W lineage from HIV positive patient from Siberia // Genom Data. – 2016. – 10. – Pp. 61-62. doi: 10.1016/j.gdata.2016.08.001.
157. Singh S., Goswami N., Tyagi A. K., Khare G. Unraveling the role of the transcriptional regulator VirS in low pH-induced responses of *Mycobacterium tuberculosis* and

identification of VirS inhibitors // *J. Biol. Chem.* – 2019. – 294. – Pp. 10055–10075. doi: 10.1074/jbc.RA118.005312

158. Singh V., Chibale K. Strategies to combat multi-drug resistance in tuberculosis // *Acc. Chem. Res.* – 2021. - 54(10). - Pp. 2361-2376. doi: 10.1021/acs.accounts.0c00878.

159. Sivaramakrishnan S., Ortiz de Montellano P. R. The DosS-DosT/DosR Mycobacterial sensor system // *Biosensors (Basel)*. – 2013. - 3(3). – Pp. 259-282. doi: 10.3390/bios3030259.

160. Skjærning R. B., Senissar M., Winther K. S. The RES domain toxins of RES-Xre toxin-antitoxin modules induce cell stasis by degrading NAD⁺ // *Mol. Microbiol.* – 2019. - 111(1). - 221-236. doi: 10.1111/mmi.14150.

161. Slayden R. A., Dawson C. C., Cummings J. E. Toxin-antitoxin systems and regulatory mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* // *Pathog. Dis.* – 2018. - 76(4). Pp. 1-28. doi: 10.1093/femspd/fty039.

162. Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E., Obinger, C. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG) // *J. Inorg. Biochem.* – 2006. – 100. – Pp. 568-585. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2006.01.033.

163. Snapper S. B., Melton R. E., Mustafa S. et al. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis* // *Mol. Microbiol.* – 1990. - 4(11). – Pp. 1911–1919. doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x.

164. Song S., Wood T. K. Toxin/antitoxin system paradigms: toxins bound to antitoxins are not likely activated by preferential antitoxin degradation // *Adv. Biosyst.* – 2020. - 4(3):e1900290. - Pp. 1-5. doi: 10.1002/adbi.201900290.

165. Soo V. W., Cheng H. Y., Kwan B. W. de novo synthesis of a bacterial toxin/antitoxin system // *Sci. Rep.* – 2014. – 4(4807). - Pp. 1-9. doi: 10.1038/srep04807.

166. Sparks I. L., Derbyshire K. M., Jacobs W. R., Morita Y. S. *Mycobacterium smegmatis*: the vanguard of Mycobacterial research // *J. Bacteriol.* – 2023. - 205(1): e00337-22. – Pp. 1-16. doi: 10.1128/jb.00337-22.

167. Srivastava A., Pati S., Kaushik H., et al. Toxin-antitoxin systems and their medical applications: current status and future perspective // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2021. - 105(5). - Pp. 1803-1821. doi: 10.1007/s00253-021-11134-z.

168. Stanger F. V., Harms A., Dehio C., et al. Crystal structure of the *Escherichia coli* Fic toxin-like protein in complex with its cognate antitoxin // *PLoS One.* – 2016. - 11(9):e0163654. – Pp. 1-21. doi: 10.1371/journal.pone.0163654.

169. Stieber D., Gabant P., Szpirer C. The art of selective killing: plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications // *Biotechniques*. – 2008. - 45(3). – Pp. 344-346. doi: 10.2144/000112955.
170. Stone E. A., Sidow A. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity // *Genome Res*. - 2005. – 15(7). - Pp. 978–986. doi: 10.1101/gr.3804205.
171. Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // *Methods Enzymol*. – 1990. – 185. – Pp. 60-89. doi: 10.1016/0076-6879(90)85008-c.
172. Su H., Wang W., Du Z., et al. Improved protein structure prediction using a new multi-scale network and homologous templates // *Advanced Science*. – 2021. – 8(2102592). – Pp. 1-11. doi: 10.1002/advs.202102592.
173. Świąciło A., Zych-Wężyk I. Bacterial stress response as an adaptation to life in a soil environment // *Pol. J. Environ. Stud*. – 2013. – 22(6). – Pp. 1577-1587.
174. Takagi H., Kakuta Y., Okada T., et al. Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects // *Nat. Struct. Mol. Biol*. – 2005. - 12(4). – Pp. 327-331. doi: 10.1038/nsmb911.
175. Takayama S., Bimston D. N., Matsuzawa S. et al. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70 // *The EMBO Journal*. – 1997. – 16(16). - Pp.4887–4896. doi: 10.1093/emboj/16.16.4887.
176. Talwar S., Pandey M., Sharma C., et al. Role of VapBC12 toxin-antitoxin locus in cholesterol-induced mycobacterial persistence // *mSystems*. – 2020. - 5(6): e00855-20. – Pp. 1-26. doi: 10.1128/mSystems.00855-20.
177. Tandon H., Sharma A., Wadhwa S., et al. Bioinformatic and mutational studies of related toxin–antitoxin pairs in *Mycobacterium tuberculosis* predict and identify key functional residues // *J. Biol. Chem*. - 2019. - 294(23). – Pp. 9048–9063. doi: 10.1074/jbc.RA118.006814.
178. Tandon H., Vattekatte A. M., Srinivasan N., Sandhya S. Molecular and structural basis of cross-reactivity in *M. tuberculosis* toxin–antitoxin systems // *Toxins (Basel)*. – 2020. - 12(8): 481. – Pp. 1-22. doi: 10.3390/toxins12080481.
179. Texier P., Bordes P., Nagpal J., et al. ClpXP-mediated degradation of the TAC antitoxin is neutralized by the SecB-like chaperone in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Mol. Biol*. – 2021. - 433(5):166815. – Pp. 1-17. doi: 10.1016/j.jmb.2021.166815.
180. Tiwari P., Arora G., Singh M., et al. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs // *Nat. Commun*. – 2015. – 6(6059). – Pp. 1-12. doi: 10.1038/ncomms7059.

181. Tiwari S., Tonder A. J., Vilchèze C., et al. Arginine-deprivation–induced oxidative damage sterilizes *Mycobacterium tuberculosis* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2018. – 115. – Pp. 9779–9784. doi: 10.1073/pnas.1808874115.
182. Torfs E., Piller T., Cos P., Cappoen D. Opportunities for overcoming *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: emerging Mycobacterial targets and host-directed therapy // Int. J. Mol. Sci. – 2019. - 20(12): 2868. – Pp. 1-23. doi: 10.3390/ijms20122868.
183. Tu C. H., Holt M., Ruan S., Bourne C. Evaluating the potential for cross-interactions of antitoxins in type II TA systems // Toxins (Basel). – 2020. - 12(6): 422. – Pp. 1-25. doi: 10.3390/toxins12060422.
184. Turnbull K. J., Gerdes K. HicA toxin of *Escherichia coli* derepresses *hicAB* transcription to selectively produce HicB antitoxin // Mol. Microbiol. – 2017. - 104(5). – Pp. 781-792. doi: 10.1111/mmi.13662.
185. Unterholzner S. J., Poppenberger B., Rozhon W. Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application // Landes Bioscience. – 2013. - 3(5). - e26219-1-13. doi: 10.4161/mge.26219.
186. Vogwill T., Comfort A. C., Furió V., MacLean R. C. Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics // J. Evol. Biol. – 2016. - 29(6). – Pp. 1223-1233. doi: 10.1111/jeb.12864.
187. Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I. Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // Arch. Microbiol. – 2021. - 203(10). - Pp. 5899-5906. doi: 10.1007/s00203-021-02585-z.
188. Walling L. R., Butler J. S. Structural determinants for antitoxin identity and insulation of cross talk between homologous toxin-antitoxin systems // Journal of Bacteriology. – 2016. - 198(24). - Pp. 3287–3295. doi: 10.1128/JB.00529-16.
189. Walling L. R. Butler J. S. Homologous VapC toxins inhibit translation and cell growth by sequence-specific cleavage of tRNA^{fMet} // J. Bacteriol. – 2018. - 200(3): e00582-17. doi: 10.1128/JB.00582-17.
190. Wang L., Maji S. K., Sawaya M. R., et al. Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure // PLoS Biol. – 2008. - 6:e195. – Pp. 1791-1801. doi: 10.1371/journal.pbio.
191. Wang S. S. S., Wu J. W., Yamamoto S., Liu H. S. Diseases of protein aggregation and the hunt for potential pharmacological agents // Biotechnol. J. – 2008. - 3(2). – Pp. 165-92. doi: 10.1002/biot.200700065.
192. Wang X., Wood T. K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response // Applied and environmental microbiology. – 2011. - 77(16). - Pp. 5577–5583. doi: 10.1128/AEM.05068-11.

193. Wang X, Zhao X., Wang H., et al. *Mycobacterium tuberculosis* toxin Rv2872 is an RNase involved in vancomycin stress response and biofilm development // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. - 102(16). – Pp. 7123-7133. doi: 10.1007/s00253-018-9132-0.
194. Wang X., Yao J., Sun Y.C., Wood T. K. Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins // *Trends Microbiol.* – 2021. - 29(5). - Pp. 388-393. doi: 10.1016/j.tim.2020.12.001.
195. Wang W., Peng Z., Yang J. Single-sequence protein structure prediction using supervised transformer protein language models // *Nature Computational Science.* – 2022. – 2. – Pp. 804-814. doi: 10.1038/s43588-022-00373-3.
196. Wayne L. G., Hayes L. G. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence // *Infect. Immun.* – 1996. – 64. – Pp. 2062–2069. doi: 10.1128/IAI.64.6.2062-2069.
197. Wayne L. G., Sohaskey C. D. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*// *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – 55. – Pp. 139–163. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.139.
198. Weaver K. The Fst/Ldr family of type I TA system toxins: potential roles in stress response, metabolism and pathogenesis // *Toxins (Basel).* – 2020. - 12(8): 474. - Pp. 1-12. doi: 10.3390/toxins12080474.
199. Williams K. J., Joyce G., Robertson B. D. Improved Mycobacterial tetracycline inducible vectors // *Plasmid.* – 2010. - 64(2). – Pp. 69–73. doi: 10.1016/j.plasmid.2010.04.003.
200. Winther K., Tree J. J., Tollervey D., Gerdes K. VapCs of *Mycobacterium tuberculosis* cleave RNAs essential for translation // *Nucleic Acids Res.* – 2016. - 44(20). – Pp. 9860–9871. doi: 10.1093/nar/gkw781.
201. Wood T. K. Combatting bacterial persister cells // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2016. - 113(3). - Pp. 476–483. doi: 10.1002/bit.25721.
202. Yamaguchi Y., Park J. H., Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea // *Annu. Rev. Genet.* – 2011. – 45. - Pp. 61-79. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132412.
203. Yang M., Gao C., Wang Y., et al. Characterization of the interaction and cross-regulation of three *Mycobacterium tuberculosis relBE* modules // *PLoS One.* - 2010. - 5(5): e10672. – Pp. 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0010672.
204. Yang Q. E., Walsh T. R. Toxin–antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2017. - 41(3). – Pp.343–353. doi: 10.1093/femsre/fux006.

205. Yao J., Zhen X., Tang K., et al. Novel polyadenylation-dependent neutralization mechanism of the HEPN/MNT toxin/antitoxin system // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – 48. - Pp. 11054–11067. doi: 10.1093/nar/gkaa855.
206. Yin Y., Feng X., Yu H., et al. Structural basis for aggregate dissolution and refolding by the *Mycobacterium tuberculosis* ClpB-DnaK bi-chaperone system // *Cell Rep.* – 2021. - 35(8):109166. – Pp. 1-35. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109166.
207. Yu X., Gao X., Zhu K. *et al.* Characterization of a toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism // *Commun. Biol.* – 2020. - 3(216). - Pp. 1-15. doi: 10.1038/s42003-020-0941-1.
208. Zakharevich N. V., Zaychikova M. V., Shur K. V., et al. Sequencing and analysis of three *Mycobacterium tuberculosis* genomes of the B0/N-90 sublineage // *Microbiol. Resour. Announc.* – 2019. - 8(39). - e00796-19, doi: 10.1128/MRA.00796-19.
209. Zaychikova M. V., Zakharevich N. V., Sagaidak M. O., et al. *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). - e0143682. – pp. 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0143682.
210. Zhang X., Studier F. W. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme // *J. Mol. Biol.* – 1997. – 269. – Pp. 10-27. doi: 10.1006/jmbi.1997.1016.
211. Zhang S. P., Wang Q., Quan S. W., et al. Type II toxin-antitoxin system in bacteria: activation, function, and mode of action // *Biophys. Rep.* - 2020. - 6(2–3). – Pp. 68–79. doi: 10.1007/s41048-020-00109-8.
212. Zhang L. Y., Wang C. L., Yan M. Y., et al. Toxin-antitoxin systems alter adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to environmental stress // *Microbiol. Spectr.* – 2022. - 10(6):e0281522. – Pp. 1-10. doi: 10.1128/spectrum.02815-22.
213. Zhu L., Sharp J. D., Kobayashi H., et al. Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxins can physically and functionally interact // *J. Biol. Chem.* – 2010. – 285. – Pp. 39732–39738. doi: 10.1074/jbc.M110.163105.

Финансирование

Часть работы, посвящённая исследованию системы ТА VarBC2 *M. smegmatis*, выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-34-90124 от 20.08.2020 «Исследование функции системы токсин-антитоксин VarBC2 *Mycobacterium smegmatis*: РНКазная и шаперонная активность, участие в устойчивости к антибиотикам».

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.