

На правах рукописи

ЗАМАХАЕВ МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

**Роль токсин-антитоксиновых систем VarBC и MazEF в
формировании фенотипической устойчивости
Mycobacterium smegmatis к антибиотикам**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в группе редактирования геномов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель: Шумков Михаил Сергеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Официальные оппоненты: Владимирский Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции ФГБУ «Национальный Медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России

Ермолаева Светлана Александровна, доктор биологических наук, зав. лабораторией экологии возбудителей инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Ведущая организация: ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита состоится 28 мая 2026 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологий» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский просп., д. 33, стр. 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <https://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Одной из главных проблем современного здравоохранения являются всё учащающиеся случаи неудачной антибиотикотерапии. Наиболее очевидная причина этого заключается в том, что успешное использование антибактериальных препаратов может быть скомпрометировано развитием бактериальной резистентности. Хотя генетически обусловленная устойчивость к антибиотикам является основной, существуют механизмы, при которых бактерии могут избежать летального действия данных соединений путём перехода в физиологические состояния, в котором антибактериальные агенты не убивают их – к ним, например, относятся такие явления, как состояние покоя, а также персистенция.

Согласно статистике ВОЗ, заболевание туберкулёзом является одной из самых распространённых причин гибели людей в результате поражения инфекционными заболеваниями. Во многих случаях переход этого заболевания в острую форму связан с реактивацией латентной формы инфекции, носителями которой являются миллиарды людей по всему миру. Развитие латентной формы заболевания обусловлено способностью возбудителя инфекции – *Mycobacterium tuberculosis* (МТВ) – образовывать покоящиеся формы, для которых характерна способность пребывать в неактивном состоянии на протяжении длительного времени, но реактивировать при благоприятных условиях, например, при ослаблении иммунной системы хозяина. Кроме того, помимо состояния глубокого покоя, существуют промежуточные состояния, например, бактериальная персистенция. Все эти состояния также связаны с формированием возбудителем устойчивости к антибактериальным препаратам, которая носит фенотипический, ненаследуемый характер и связана, по-видимому, с физиологическими процессами, происходящими внутри клеток возбудителя.

Переход бактерий в состояние покоя представляет собой сложное явление, которое характеризуется остановкой роста, сниженным уровнем метаболизма и повышенной устойчивостью к стрессовым условиям (Balaban *et al.*, 2019). Известно, что токсин-антитоксिनные (ТА) системы участвуют в формировании покоящихся клеток бактерий. В частности, это показано для системы *VapBC* у *M. smegmatis* (Demidenok *et al.*, 2014). В свою очередь, у МТВ к настоящему времени идентифицировано 79 пар ТА-локусов (Sala *et al.*, 2014). Токсины способны расщеплять матричную, транспортную и рибосомальную РНК (Winther *et al.*, 2011; Christensen *et al.*, 2003; Schifano *et al.*, 2013), регулировать генную экспрессию, изменяя спектр транслируемых белков (Guo *et al.*, 2009), участвовать в переходе

активных клеток в состояние персистенции (Maisonneuve *et al.*, 2011). Такая многофункциональность белков токсинов может быть связана с глобальными перестройками метаболизма в бактериальных клетках, за счет чего, гипотетически, ТА-локусы реализуют свою активность в качестве индукторов перехода микобактерий в состояние покоя. Для изучения молекулярных механизмов, посредством которых ТА-системы способствуют формированию микобактериями толерантности к действию антибиотиков, в качестве объекта исследования был выбран микроорганизм *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) – близкий родственник МТВ, обладающий при этом высокой скоростью роста и отсутствием факторов патогенности и поэтому широко используемый в качестве модельного объекта в исследованиях физиологии возбудителя туберкулезной инфекции.

Цель работы – определение роли токсин-антитоксिनных систем *VarBC* и *MazEF* в формировании фенотипической устойчивости *M. smegmatis* к антибиотикам.

Основные задачи исследования:

1) получить линейку рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсинов *VarC* и *MazF*, а также с делециями соответствующих ТА-локусов;

2) определить возможность активации экспрессии ТА-локусов в ответ на применение антибиотиков;

3) оценить выживаемость полученных рекомбинантных штаммов при действии антибиотиков и иных стрессовых факторов;

4) сравнить протеомные профили штамма с гиперэкспрессией токсина *VarC* и контрольного штамма дикого типа;

5) определить молекулярный механизм действия токсина *VarC* в клетках *M. smegmatis*.

Научная новизна

На сегодняшний день известные исследования участия токсинов микобактерий и, в частности, токсина *VarC* в контексте их физиологической роли проводились либо в условиях *in vitro*, либо при гиперэкспрессии *VarC*, причем преимущественно в клетках *E. coli* (Cruz *et al.*, 2015; Winther *et al.*, 2013; Winther *et al.*, 2016; McKenzie *et al.*, 2012). Авторами в основном применялись методы транскриптомики, такие как, например, *microarray*-анализ и РНК-секвенирование, но без сочетания с экспериментами, проводимыми на уровне протеомики. В ходе данной работы активность токсина *VarC* исследуется в его «естественной среде» (то есть в клетках *M. smegmatis*); кроме того, применяется сопоставление данных протеомного профилирования, анализа представленности РНК-транскриптов и экспериментов на уровне физиологии бактериальных популяций. Полученные результаты впервые раскрывают молекулярный механизм

действия токсина *VapC* в клетках *M. smegmatis*, определена мишень эндорибонуклеазной активности *VapC*, а также роль токсина в регуляции белкового синтеза в клетках в контексте адаптации бактерий к стрессовым условиям, в частности к действию антибиотиков, что может приводить к формированию фенотипической устойчивости на уровне субпопуляций клеток.

Теоретическая практическая значимость работы

По итогам проведения исследования был предложен механизм перехода клеток *M. smegmatis* в покоящееся состояние вследствие расщепления рРНК, вызванного активностью ТА-системы *VapBC*, с последующим перенаправлением белкового синтеза и инактивацией рибосом в состоянии ассоциации с цитоплазматической мембраной. Также было показано, как описанный механизм позволяет клеткам *M. smegmatis* формировать фенотипическую устойчивость к антибиотикам, направленным на подавление функциональности рибосом (на примере тетрациклина), где выживаемость отдельных клеток в общей популяции зависит от соотношения молекул токсинов и антитоксинов ТА-систем *VapBC* и *MazEF*, а также от перекрестного взаимодействия между ними. Кроме того, была установлена общность механизмов действия токсина *VapC* у *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Полученные результаты важны для понимания процессов, лежащих в основе формирования бактериями толерантности к действию антибиотиков. С практической точки зрения полученные результаты могут быть использованы при разработке принципиально новых классов антибактериальных соединений, направленных на подавление формирования клетками фенотипической устойчивости к антибиотикам и предотвращающих развитие латентных инфекций.

Методология и методы исследования

В рамках экспериментальных работ данного исследования применялись классические микробиологические методы работы с непатогенными штаммами бактерий, а также современные молекулярно-генетические и биохимические методики. Протеомное профилирование образцов бактериальных культур осуществлялось в ходе ЖХ-МС/МС анализа с последующей обработкой полученных данных биоинформатическими методами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Уровень транскрипции ТА-локусов *vapBC* и *mazEF* возрастает в присутствии тетрациклина, но не меняется при действии изониазида и ципрофлоксацина, что свидетельствует о специфической активации экспрессии исследуемых ТА-локусов в зависимости от молекулярного механизма действия антибиотиков.

2. Чувствительность *M. smegmatis* к действию тетрациклина увеличивается при делеции локуса *varBC* и зависит от взаимодействия токсин-антитоксिनных систем *VarBC* и *MazEF*.

3. В условиях гиперэкспрессии токсина *VarC* происходит активация систем общего стрессового ответа и немагистральных путей получения энергии, таких как глиоксилатный шунт и шунт гамма-аминомасляной кислоты.

4. Гиперэкспрессия токсина *VarC* приводит к увеличению представленности рибосом в мембранной фракции клеток *M. smegmatis*, но вызывает снижение представленности аминокил-тРНК-синтетаз и факторов элонгации трансляции, что может влиять на чувствительность к антибиотикам, ингибирующим трансляцию.

5. Действие токсина *VarC M. smegmatis* обусловлено расщеплением сарцин-рициновой петли 23S рРНК в участке, почти полностью совпадающем с мишенью токсина *VarC20 M. tuberculosis*, и приводит к инактивации рибосом и их ассоциации с цитоплазматической мембраной.

Личный вклад автора

Диссертант лично участвовал в разработке плана исследований, проведении большинства экспериментов, анализе полученных результатов и подготовке научных публикаций.

Степень достоверности результатов исследования обеспечена за счет их воспроизводимости и независимости проведенных экспериментов друг от друга. Полученные данные подвергались обработке современными методами статистического анализа.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертационного исследования было опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в список ВАК, а также индексируемых в научных базах данных Web of Science и Scopus. Результаты работы были представлены на ряде научных конференций, таких как: II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Пущино, 2015; Научная конференция молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, 2016; Международная конференция Федерации Европейских Биохимических Обществ (FEBS), Иерусалим, Израиль, 2017 и других.

Структура и объем работы

Полный объем диссертации составляет 225 страниц, в том числе 23 рисунка и 8 таблиц. Список литературы содержит 390 наименований. Описание представляемого исследования включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список используемых источников и приложения.

Список сокращений

МТВ – *Mycobacterium tuberculosis*; wt (англ. wild type) – дикий тип; ЖХ-МС – жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией; КОЕ – колониеобразующие единицы; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; НВЧ – наиболее вероятное число; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией; ТА – токсин-антитоксин.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Обзор литературы (Глава 1) состоит из трех разделов и посвящен: классификации и функциям ТА-систем (1), проблемам бактериальной персистенции и фенотипической устойчивости к антибиотикам (2), применению ТА-систем в новых стратегиях борьбы с патогенными бактериями (3).

Материалы и методы (Глава 2) содержат подробное описание используемых в работе методик: используемые бактериальные штаммы, питательные среды, условия культивирования, создание генетических конструкций, определение минимальных ингибирующих концентраций, оценка выживаемости в условиях действия антибиотиков, измерение НВЧ клеток, фракционирование клеток, экстракция белка и ЖХ-МС/МС анализ, количественный и качественный протеомный анализ, выделение РНК, РНК-секвенирование на платформе Illumina, количественный ПЦР-анализ в реальном времени, анализ методом удлинения праймера.

Результаты и обсуждение представлены в Главе 3 диссертационной работы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Используемые бактериальные штаммы

Классический путь исследования функциональности генов, как правило, заключается в конструировании штаммов с гиперэкспрессией или делецией целевых генов, поэтому для исследования роли ТА-локусов *vapBC* и *mazEF* в формировании персистирующих форм бактерий была подготовлена линейка рекомбинантных штаммов. В частности, был клонирован ген *mazF* штамма *M. smegmatis* mc²155 в плазмидный вектор pMind под регулируемым тетрациклином промотором. На основе штамма дикого типа *M. smegmatis* mc²155 был получен рекомбинантный штамм, содержащий плазмиду pMind с клонированным геном *mazF*, в то время как штамм с гиперэкспрессией гена *vapC* был взят из коллекции лаборатории. Также в работе использовались штаммы с делециями ТА-локусов: $\Delta vapBC$, $\Delta mazEF$ и двойной делеционный мутант $\Delta vapBC \Delta mazEF$ (таблица 1). В качестве контроля использовался рекомбинантный штамм дикого типа, трансформированный плазмидой pMind без вставок (wt-pMind).

Таблица 1 – Рекомбинантные штаммы *M. smegmatis* mc²155, используемые в работе

Название	Характеристика	Источник
wt-pMind	Контрольный штамм, несущий плазмиду pMind	Лабораторная коллекция
wt-pMind- <i>varC</i>	Штамм с гиперэкспрессией токсина VarC	Лабораторная коллекция
wt-pMind- <i>mazF</i>	Штамм с гиперэкспрессией токсина MazF	Сконструирован в ходе данной работы
Δ <i>varBC</i>	Штамм с делецией локуса <i>varBC</i>	Лабораторная коллекция
Δ <i>mazEF</i>	Штамм с делецией локуса <i>mazEF</i>	Сконструирован в ходе данной работы
Δ <i>varBC</i> Δ <i>mazEF</i>	Штамм с делецией локусов <i>varBC</i> и <i>mazEF</i>	Сконструирован в ходе данной работы

1. Применение антибиотика способно вызывать активацию экспрессии ТА-локусов

Обычно системы клеточной защиты активируются в ответ на определенный стресс. В то же время бактерии способны вырабатывать общую стрессовую реакцию, позволяющую клеткам предварительно адаптироваться к широкому спектру стрессовых условий независимо от природы исходного стрессового фактора (Gottesman *et al.*, 2019). В частности, покоящиеся бактерии благодаря остановке роста и снижению скорости метаболизма нередко могут оставаться толерантными к различным стрессовым условиям, в том числе к действию антибиотиков (Amato *et al.*, 2013), демонстрируя тем самым общую стрессоустойчивость. Покоящееся состояние бактерий можно рассматривать как механистическую основу персистенции (Zou *et al.*, 2022), а персистентные бактерии, в свою очередь, могут формироваться как спонтанно, так и в результате запуска специфического стрессового сигнала (Balaban *et al.*, 2019). Исходя из этого, было целесообразно проверить следующую гипотезу: может ли внесение антибиотика в среду, где происходит культивирование клеток *M. smegmatis*, вызвать активацию транскрипции генов ТА-систем?

Методом количественного ПЦР-анализа в реальном времени была проведена оценка изменения уровней относительной экспрессии генов *varC* и *mazF* после экспозиции с такими антибактериальными препаратами, как ципрофлоксацин, изониазид и тетрациклин. Антибиотики на этапе планирования данного эксперимента были подобраны по принципу реализации принципиально разных механизмов действия. В частности, ципрофлоксацин вмешивается в процессы, связанные с репликацией ДНК, изониазид ингибирует сборку компонентов клеточной стенки микобактерий,

в то время как тетрациклин подавляет биосинтез белка. По результатам проведения количественного ПЦР-анализа было установлено, что относительный уровень транскрипции гена *vapC* увеличился в $10,9 \pm 6,7$ раз после 2 ч инкубации с тетрациклином. При этом относительная транскрипция гена *mazF* возросла в $4,2 \pm 1,8$ раз. Данный результат указывает на индуцируемую природу увеличения уровней транскрипции генов токсинов *VapC* и *MazF* после введения тетрациклина. Однако добавка к анализируемым культурам цiproфлоксацина в концентрации 2,5 мкг/мл, а также изониазида (100 мкг/мл) с последующим инкубированием в течение 2 ч не вызвала статистически значимого изменения относительной транскрипции генов токсинов в изучаемых ТА-системах (рисунок 1).

Таким образом, исходя из молекулярного механизма действия тетрациклина, повышение внутриклеточного уровня мРНК исследуемых токсинов наблюдалось при ингибировании процесса синтеза белка на рибосомах.

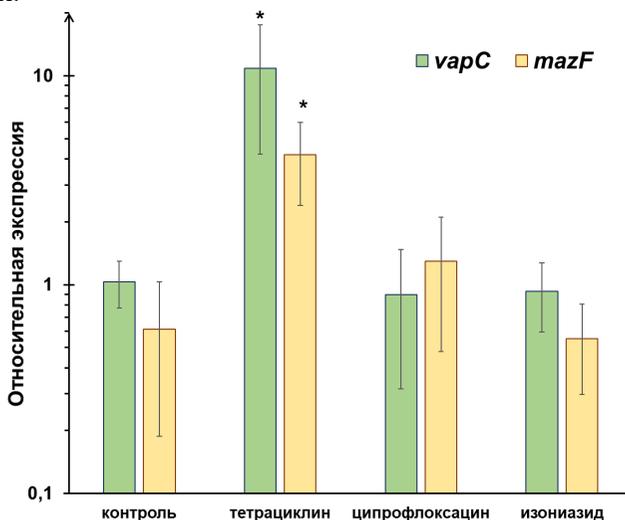


Рисунок 1 – Результаты ОТ-ПЦР, выполненной с образцами РНК *M. smegmatis*, выделенной после двухчасового культивирования в присутствии цiproфлоксацина (2,5 мкг/мл), изониазида (100 мкг/мл) и тетрациклина (5 мкг/мл). Представленность мРНК генов *vapC* и *mazF* рассчитывалась относительно ампликонов гена, кодирующего 16S рРНК *M. smegmatis*. Данные представлены в формате среднее ± стандартное отклонение. Символ (*) указывает на статистически значимое различие результата в сравнении с контролем при $p \leq 0,05$

2. Протеомное профилирование штамма с гиперэкспрессией VarC указывает на ассоциацию рибосом с клеточной мембраной и активацию общего стрессового ответа

По результатам ранее проделанных экспериментов, известно, что штамм *M. smegmatis*, несущий плазмиду pMind со вставкой гена токсина VarC, при индукции гиперэкспрессии испытывает торможение роста вплоть до полной остановки. Получаемые при этом клетки характеризуются изменённой морфологией (так называемые овоидные формы), сниженной метаболической и дыхательной активностью, отсутствием деления – то есть соответствуют критериям покоящихся клеток (Demidenok *et al.*, 2014; 2016). Появление подобного фенотипа свидетельствует о глобальных физиологических изменениях в клетках данного штамма, что может быть связано с вызванными токсином VarC метаболическими перестройками в рамках перенаправления белкового синтеза.

Чтобы оценить степень и характер влияния гиперэкспрессии токсина VarC на белковый состав клеток *M. smegmatis* было проведено протеомное профилирование образцов штамма *M. smegmatis* wt-pMind-varC и контрольного штамма wt-pMind, несущего плазмидный вектор pMind без инсерции целевого гена токсина. Для получения белковых профилей образцов вышеупомянутых штаммов был применен метод жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), были проанализированы фракции мембранных белков в полученных белковых профилях.

По результатам проведенной идентификации было выявлено суммарно 887 белков, присутствующих во всех проанализированных образцах штамма wt-pMind-varC, а также 583 белка, обнаруженных во всех образцах контрольного штамма wt-pMind. Проведение количественного протеомного анализа позволило идентифицировать группу дифференциальных полипептидов, причем критериями для соответствующего отбора стало (1) присутствие конкретного белка во всех анализируемых образцах целевого и контрольного штаммов, а также (2) изменение представленности белка – как уменьшение, так и увеличение – не менее, чем в 2 раза по сравнению с контролем. Таким образом, по итогам анализа, в условиях гиперэкспрессии VarC было отобрано 107 дифференциальных белков с повышенной и 88 со сниженной представленностью.

Следующим шагом в анализе данных, полученных в результате протеомного профилирования, стало распределение дифференциальных белков по функциональным категориям, по итогам которого появилась возможность оценить, на какие процессы, происходящие в клетках *M. smegmatis*, оказала влияние гиперэкспрессия токсина VarC. В частности,

в протеомном профиле штамма *wt-pMind-vapC* наиболее заметное перераспределение было выявлено для групп белков, задействованных в трансляционном аппарате (рисунок 2).

Результаты анализа представленности дифференциальных полипептидов также были дополнены данными об уникальных белках, обнаруженных либо только в образцах контрольного (*wt-pMind*), либо анализируемого штамма (*wt-pMind-vapC*). Как видно из рисунка 2, в мембранной фракции белкового профиля образцов штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией *VapC* происходит заметный рост представленности белков, входящих в состав рибосом (всего 16 различных протеинов), а также фактора инициации трансляции IF-2 (MSMEG_2628 – в 3,17 раз); в то же время это сопровождалось снижением содержания аминоксил-тРНК-синтетаз (среди них 4 белка: MSMEG_3003, MSMEG_4485, MSMEG_6413, MSMEG_2931), фактора элонгации трансляции Tu (MSMEG_1401 – в 6,97 раз) и ряда белков нерибосомного пути биосинтеза пептидов (MSMEG_0400 – MSMEG_0402).

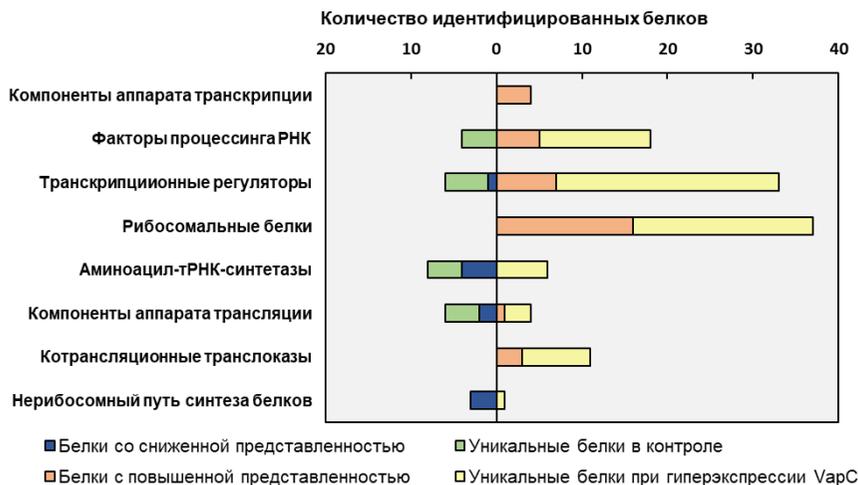


Рисунок 2 – Изменения в представленности функциональных групп белков, вовлеченных в процесс биосинтеза белка, в мембранной фракции протеомного профиля штамма *wt-pMind-vapC*

Таким образом, в мембранной фракции белкового профиля образцов штамма *wt-pMind-vapC* был дополнительно обнаружен 21 рибосомальный белок, а также фактор гибернации рибосом HPF (MSMEG_1878). Ряд белков был идентифицирован только в мембранной фракции контрольного штамма *wt-pMind*, но не в образцах штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина *VapC*: среди них 3 фактора высвобождения пептидных цепей

(MSMEG_1316, MSMEG_2086 и MSMEG_4950), фактор элонгации трансляции Ts (MSMEG_2520), 4 аминоксил-тРНК-синтетазы (MSMEG_4959, MSMEG_6074, MSMEG_3169, MSMEG_5441) и фактор рециркуляции рибосом (MSMEG_2541).

Процесс биосинтеза белка в клетках нередко сочетается с котрансляционным переносом новообразованных полипептидов через цитоплазматическую мембрану. В анализируемых протеомных профилях штамма wt-pMind-*varC* в качестве уникальных белков были идентифицированы 3 препротейновых транслоказы, относящихся к семейству белков Sec (MSMEG_1483, MSMEG_2961, MSMEG_2962), компонент протеиновой инсертазы внутренней мембраны YidC (MSMEG_6942), а также сигнальный распознающий белок FtsY (MSMEG_2424). Эти факты коррелируют с данными о представленности дифференциальных белков в этой категории – таких, как, например, двух субъединиц препротейнотранслоказы SecA (MSMEG_3654 и MSMEG_1881 – увеличение представленности в 2,77 и 26,85 соответственно), а также компонента сигнального распознающего комплекса Ffh (MSMEG_2430 – увеличение представленности в 3,17 раз). Поскольку была проанализирована фракция, обогащённая мембранными белками (но не ограниченная лишь ими), приведённые выше факты свидетельствуют в пользу ассоциации рибосом с цитоплазматической мембраной. Рибосомы могут быть заякорены на мембране посредством Sec-комплекса, и в таком состоянии они способны осуществлять синтез полипептидных цепей с одновременной котрансляционной транслокацией белков через мембрану (Feltcher *et al.*, 2010).

Дальнейший анализ протеомных данных позволил отследить определенные изменения в первичных метаболических и регуляторных процессах в условиях гиперэкспрессии *VarC*. В частности, было обнаружено снижение представленности ряда ферментов, участвующих в гликолизе (среди них: пируваткиназа MSMEG_3227, субъединицы пируватдегидрогеназы MSMEG_2280, MSMEG_4323, MSMEG_0903), цикле трикарбоновых кислот (например, аконитатгидратаза MSMEG_3143, фумаратгидратаза MSMEG_5240) и пентозофосфатном пути метаболизма углеводов (транскетолаза MSMEG_3103). При этом увеличилась представленность цитратсинтазы MSMEG_5672, участвующей в глиоксилатном шунте, в то время как изоцитратлиаза MSMEG_0911 была заменена изоферментом MSMEG_3706. Аналогичное явление наблюдалось и в случае шунта гамма-аминомасляной кислоты, а именно сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа MSMEG_6452 была заменена изоферментом MSMEG_0889.

Одновременно с этим, при гиперэкспрессии *VarC* наблюдались значительные изменения в представленности белков стрессового ответа. В

этой группе наибольшую представленность продемонстрировал белок углеродного голодания A (MSMEG_2259) (увеличение в 29,2 раза по сравнению с контролем), за ним следует ГТФ-пирофосфокиназа RelA (MSMEG_2965) с четырехкратным увеличением представленности относительно контроля. В то же время, некоторые полипептиды, связанные с ответом на окислительный стресс, например, каталаза MSMEG_3461, белки FeS-комплекса MSMEG_3122 и MSMEG_3124, а также тиоредоксинредуктаза MSMEG_1516, обладали сниженной представленностью.

Наконец, протеомное профилирование образцов с гиперэкспрессией токсина VapC продемонстрировало повышенную представленность протеазы ClpP (MSMEG_4672), сопровождающуюся снижением представленности шаперонов GroEL (MSMEG_0880) и DnaK (MSMEG_0709), тогда как белки теплового шока, такие как субъединица протеазы ClpX (MSMEG_4671) и молекулярный шаперон DnaJ (MSMEG_0711, MSMEG_4504) были идентифицированы как уникальные протеины.

В целом, проведённое протеомное профилирование выявило изменения, указывающие на переход клеток к альтернативным процессам производства энергии, активацию биохимических путей, связанных с развитием общего стрессового ответа на индукцию гиперэкспрессии VapC. Эти протеомные особенности, очевидно, должны оказывать влияние на физиологию микобактериальных клеток.

3. TA-система VapBC помогает клеткам избегать действия тетрациклина

Ввиду продемонстрированного в клетках *M. smegmatis* перенаправления белкового синтеза, выраженного в измененной представленности полипептидов, задействованных как в общих процессах метаболизма, так и в процессах, связанных с адаптацией бактерий к неблагоприятным условиям, возникла гипотеза о том, что такие масштабные перестройки белкового профиля могут вести и к формированию иных фенотипов бактерий с измененными физиологическими характеристиками.

В текущем исследовании было проведено сравнение устойчивости штаммов *M. smegmatis* wt-pMind-vapC и Δ vapBC с контрольным штаммом дикого типа в условиях действия антибиотиков. На начальном этапе данной серии экспериментов для всех штаммов *M. smegmatis* были измерены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для таких антибиотиков, как тетрациклин, цiproфлоксацин и изониазид. Проведенное измерение показало отсутствие существенных различий МИК между образцами культур анализируемых штаммов *M. smegmatis*. Для оценки выживаемости клеток исследуемых культур в условиях действия

антибиотиков были использованы одинаковые концентрации каждого антибиотика, при этом они превышали измеренные МИКи не менее, чем в 10 раз.

Проведенные эксперименты по определению выживаемости культур *M. smegmatis* wt-pMind-*vapC* и Δ *vapBC* в условиях действия антибиотиков при сопоставлении относительных величин КОЕ анализируемых образцов с соответствующими контролями не продемонстрировали статистически значимых различий после двадцатичетырехчасового воздействия изониазида (2,5 мкг/мл) и ципрофлоксацина (100 мкг/мл). Однако в условиях инкубирования с тетрациклином (5 мкг/мл) через 24 ч для штамма Δ *vapBC* было установлено существенное снижение величины КОЕ – до $0,77 \pm 0,76$ % от исходных значений (рисунок 3).

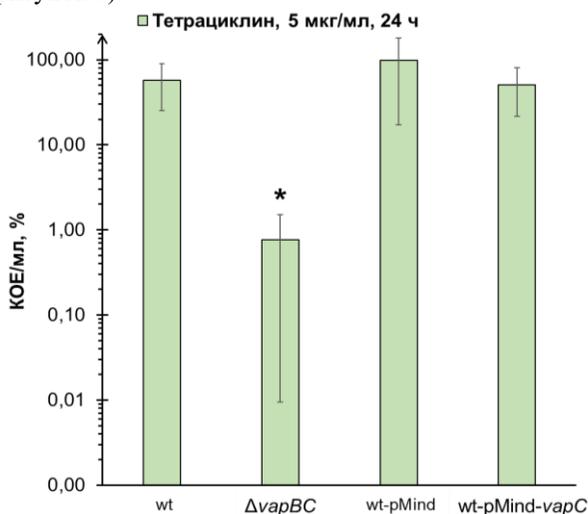


Рисунок 3 – Токсин *VapC* влияет на восприимчивость клеток *M. smegmatis* к действию тетрациклина. Данные представлены в относительных единицах КОЕ/мл (%), которые рассчитывались относительно количества КОЕ/мл в культурах до стрессового воздействия. Звездочка (*) указывает на статистически значимые различия с соответствующей контрольной культурой при $p \leq 0,05$

Поскольку для образцов культур штамма wt-pMind-*vapC* не было зафиксировано значимого изменения жизнеспособности в аналогичных условиях, возникла гипотеза о влиянии иного фактора на эффект действия тетрациклина. Таким фактором может выступать существующая в геноме клеток *M. smegmatis* другая токсин-антитоксиновая система, а именно локус *mazEF*. Для дальнейшего изучения влияния тетрациклина на

жизнеспособность штаммов *M. smegmatis* в последующие эксперименты были взяты штамм $\Delta mazEF$ и двойной делеционный мутант $\Delta vapBC\Delta mazEF$. Через 24 ч культивирования в среде с тетрациклином (5 мкг/мл) жизнеспособность штамма $\Delta mazEF$ относительно контрольных образцов *M. smegmatis* дикого типа не изменилась (рисунок 4). Однако для штамма $\Delta vapBC\Delta mazEF$ с делецией двух ТА-локусов был продемонстрирован возврат к фенотипу дикого типа, что свидетельствует об устранении причины гибели клеток, наблюдаемой для штамма с делецией *vapBC*. Спустя 48 часов культивирования в среде с тетрациклином эффекты участия локуса *mazEF* проявились еще сильнее: так, образцы культур штамма $\Delta vapBC\Delta mazEF$ продемонстрировали не только возвращение фенотипа штамма $\Delta vapBC$ к варианту дикого типа, но также и более высокую устойчивость клеток к воздействию тетрациклином. Схожий уровень величин КОЕ наблюдался и в отношении штамма $\Delta mazEF$ (рисунок 4).

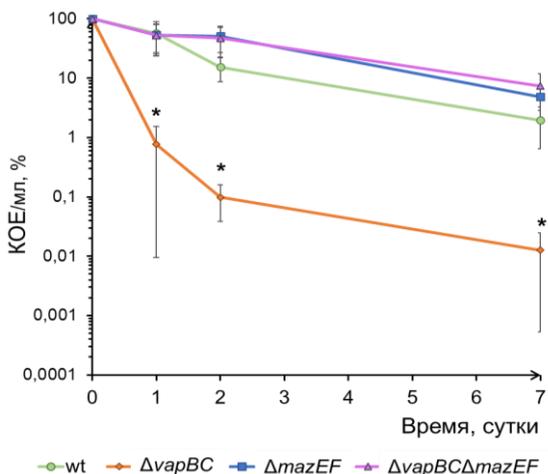


Рисунок 4 – ТА-локусы *vapBC* и *mazEF* влияют на жизнеспособность штаммов *M. smegmatis* в условиях культивирования в питательной среде с тетрациклином. Конечные результаты были рассчитаны как отношение величин КОЕ/мл (%) в конкретной временной точке к моменту до введения антибиотика в среду и представлены в формате средних значений \pm стандартное отклонение. Символом звездочки (*) отмечены статистически значимые различия с контрольной культурой дикого типа при $p \leq 0,05$

Как известно, микобактерии способны переходить в покоящееся состояние, одним из признаков которого является некультивируемость, то есть способность клеток сохранять жизнеспособность, при этом не давая

роста колоний на чашках с плотными питательными средами, а значит величины КОЕ не всегда полностью отражают истинную выживаемость. Доля покоящихся форм в пределах бактериальной популяции может быть установлена методом сопоставления величин КОЕ с результатами измерения показателя наиболее вероятного числа (НВЧ) клеток (Karpelyants *et al.*, 1994). Результаты данного сравнения представлены в таблице 2.

Проведение соответствующего анализа выявило наибольшее количество покоящихся клеток у штамма *ΔvapBC*, что, вероятно, указывает на участие токсина MazF в образовании таких форм под действием тетрациклина. Следует отметить, что наблюдаемая максимальная доля некультивируемых бактериальных клеток в случае штамма *ΔvapBC* не исключает возможности участия токсина VarC в запуске перехода в состояние покоя, но предполагает существование сложного комплекса взаимодействующих молекул, в котором токсины VarC и MazF играют заметную роль. Реверсия фенотипа двойного делеционного мутанта (штамм *ΔvapBCΔmazEF*) к уровню НВЧ дикого типа подтверждает идею перекрёстного взаимодействия ГА-систем (таблица 2).

Таблица 2 – Значения величин КОЕ и НВЧ во временной точке 48 ч культивирования в среде с добавкой тетрациклина в концентрации 5 мкг/мл. *Курсивом* отмечены статистически значимые различия, рассчитанные относительно контрольного штамма дикого типа (wt). **Жирным** шрифтом обозначено статистически достоверное различие между величинами КОЕ и НВЧ ($p \leq 0,05$)

Штамм	КОЕ, %	НВЧ, %	НВЧ/КОЕ
wt	15,4 ± 6,6	22,9	1,5
<i>ΔvapBC</i>	<i>0,1 ± 0,1</i>	<i>1,6 ± 0,7</i>	15,6
<i>ΔmazEF</i>	51,2 ± 24,2	43,8 ± 10,8	0,9
<i>ΔvapBCΔmazEF</i>	47,0 ± 4,5	72,9 ± 26,4	1,6

Вероятно, каждый из двух модулей – и VarBC, и MazEF – выступает в качестве значимого фактора для формирования покоящихся клеток в определенных специфических условиях. Косвенным подтверждением этого предположения может служить обнаружение активации экспрессии генов *varC* и *mazF* под действием тетрациклина по результатам ПЦР-анализа (рисунк 1). Увеличение содержания соответствующих токсинов в клетках, с одной стороны, способствует развитию общего стрессового ответа и приводит к формированию субпопуляции покоящихся клеток, устойчивых к действию антибиотика. С другой стороны, это приводит к гибели части популяции бактерий по механизму, напрямую не связанному с действием антибиотика, а обусловленному активностью токсина MazF. Судьба

конкретной клетки в данном случае, по-видимому, зависит от соотношения концентраций компонентов ТА-систем.

4. Раскрытие молекулярного механизма активности токсина *VarC* в клетках *M. smegmatis*

Из литературных данных известно, что разнообразные гомологи токсина *VarC* способны реализовывать эндонуклеазную активность в отношении как молекул тРНК, так и рРНК. Для установления молекулярной мишени токсина *VarC* в клетках *M. smegmatis* в рамках данной работы был осуществлен анализ целостности молекул рРНК образцов штаммов wt-pMind-*varC*, wt-pMind и Δ *varBC* методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Дизайн праймеров для такого ПЦР-анализа был осуществлен таким образом, чтобы праймеры фланкировали сайты, содержащие предполагаемые мишени токсина *VarC*. К таким мишеням относился участок сарцирициновой петли (фрагмент 23S рРНК, включающий сайт расщепления в районе пары нуклеотидов под номером 2885, в отношении которого было установлено наличие разрезания 23S рРНК из-за активности токсинов *VarC20* и *VarC26* у *Mycobacterium tuberculosis* (Winther *et al.*, 2013; 2016)); локусы, включавшие в себя сайт с парой нуклеотидов под номерами 591 (сайт расщепления 23S рРНК, идентифицированный в покоящихся формах *M. tuberculosis* (Ignatov *et al.*, 2015)); а также пару нуклеотидов с номером 2163, что соответствует сайтам расщепления 23S рРНК под действием токсинов *MazF3* и *MazF6* в клетках *M. tuberculosis* (Schifano *et al.*, 2013). Наконец, был проведен дизайн пары праймеров, фланкирующих участок 23S рРНК в районе пар нуклеотидов 1604 – 1759 (координаты сайтов представлены относительно последовательности 23S рРНК *M. smegmatis*), который не содержит известные участки расщепления и, таким образом, в данном эксперименте он выступал в роли внутреннего контроля, относительно которого осуществлялась нормализация данных о представленности амплифицированных фрагментов, содержащих потенциальные сайты разрезания 23S рРНК (рисунок 5).

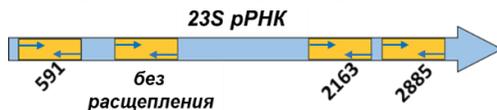


Рисунок 5 – схема взаимного расположения амплифицируемых нуклеотидных последовательностей молекулы 23S рРНК *M. smegmatis* (масштаб не соблюден)

Результаты проведенного ПЦР-анализа продемонстрировали статистически достоверное уменьшение доли ампликонов, содержащих участок расщепления 23S рРНК с координатами 2885, на $84,91 \pm 3,09$ % в образцах тотальных экстрактов РНК, выделенных из клеток штамма

M. smegmatis wt-pMind-*varC*, что свидетельствует о нарушении целостности молекул 23S рРНК именно в области сарцин-рициновой петли.

В то же время в образцах штамма Δ *varBC* ПЦР-анализ продемонстрировал более высокую степень целостности молекул 23S рРНК в сравнении с образцами wt-pMind-*varC*.

Таким образом, результаты данного эксперимента подтвердили гипотезу о VarC-зависимом расщеплении 23S рРНК в клетках *M. smegmatis* в области сарцин-рициновой петли, ввиду того что в клетках *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина VarC была зафиксировано снижение представленности ампликонов 23S рРНК, содержащих нуклеотиды с координатами 2792 – 2923 (рисунок 6).

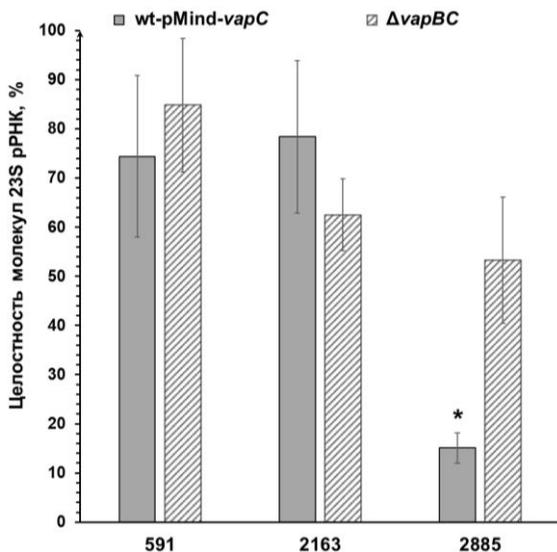


Рисунок 6 – Гиперэкспрессия токсина VarC приводит к деградации 23S рРНК в клетках *M. smegmatis* в пределах фрагмента, несущего нуклеотид с номером 2885. Доля ампликонов 23S рРНК в образцах штамма *M. smegmatis* wt-pMind-*varC* и Δ *varBC*. Расчёты проводились относительно контрольных образцов штамма *M. smegmatis* wt-pMind. Результаты представлены в формате средние значения \pm стандартное отклонение. Символом (*) отмечены статистически значимые различия между штаммами, выявленные при применении непарного t-критерия Стьюдента при $p \leq 0,05$

В целом, сарцин-рициновая петля является одной из самых длинных консервативных последовательностей в составе 23S рРНК. Кроме того, данная структура считается исключительно важной для функциональности

рибосомы, поскольку она служит мишенью для цитотоксинов, таких как α -сарцин и рицин, которые полностью блокируют трансляцию. Биохимические и структурные исследования показывают, что сарцин-рициновая петля играет решающую роль в запуске гидролиза ГТФ при функционировании факторов элонгации трансляции Tu (EF-Tu) и G (EF-G) (Shi *et al.*, 2012).

Ранее было продемонстрировано, что при переходе клеток *M. smegmatis* в состояние покоя происходит возрастание уровня экспрессии ТА-локуса *vapBC*. Так как по результатам проведённого ПЦР-анализа (рисунок 6) появились доказательства о влиянии токсина VapC на физиологические процессы в клетках *M. smegmatis* посредством разрезания 23S рРНК, предположение о VapC-опосредованном расщеплении рРНК как о ключевом этапе в процессе перехода микобактериальных клеток в состояние покоя требовало дальнейших экспериментальных подтверждений.

Для оценки целостности рибосомальной РНК в покоящихся клетках *M. smegmatis* были использованы цитозольные и мембранные фракции РНК, выделенные из овоидных покоящихся клеток, сформировавшихся в ходе применения модели постепенного закисления среды (Kudykina *et al.*, 2011). Разгонка в агарозном геле образцов тотальных экстрактов РНК в ходе электрофореза в денатурирующих условиях продемонстрировала фрагментацию 23S рРНК в мембранной фракции РНК овоидных покоящихся клеток *M. smegmatis* (рисунок 7).

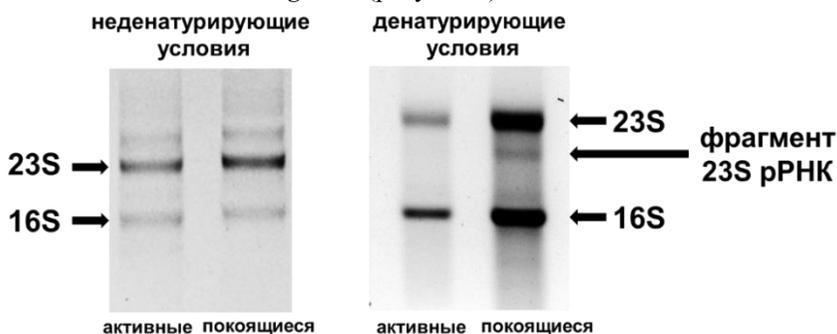


Рисунок 7 – Электрофорез мембранных экстрактов РНК, выделенных из активных и покоящихся клеток *M. smegmatis*. Стрелками указаны полосы, соответствующие 16S, 23S и фрагментированной 23S рРНК

Кроме того, образцы РНК, выделенные из мембранных фракций активных и овоидных покоящихся клеток *M. smegmatis*, были проанализированы с помощью секвенирования на платформе Illumina. По результатам РНК-секвенирования было детектировано повышенное (более,

чем в 5 раз) содержание 23S рРНК в мембранной фракции покоящихся клеток *M. smegmatis* по сравнению с активными клетками, что указывало на усиленную ассоциацию рибосом с цитоплазматической мембраной, выступавшей в роли потенциального депо законсервированных рибосом (рисунок 8).

Увеличение представленности рибосомальных белков в мембранной фракции протеомного профиля штамма *M. smegmatis* wt-pMind-*varC* также свидетельствует о накоплении определенной доли рибосом в мембранно-ассоциированном состоянии. Приведенные выше доводы хорошо согласуются с упомянутой гипотезой о закоривании инактивированных рибосом в цитоплазматической мембране и в экспериментальном плане подтверждаются выраженным снижением представленности факторов элонгации EF-Tu (*MSMEG_1401*) и EF-G (*fusA*), а также фактора рециркуляции рибосом (*frr*) в протеомных профилях мембранной фракции образцов штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией *VarC*.

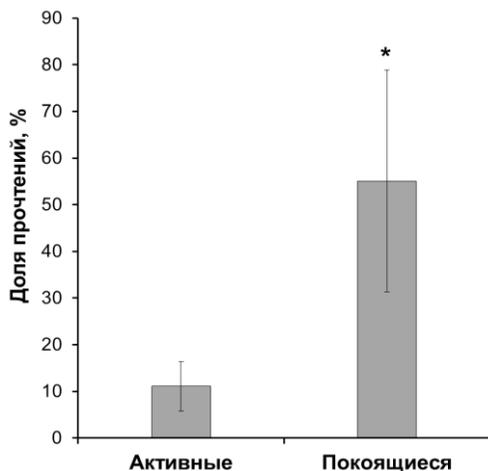


Рисунок 8 – Обогащение мембранной фракции покоящихся овоидных клеток *M. smegmatis* молекулами 23S рРНК. Представленность транскриптов гена, кодирующего 23S рРНК, рассчитывалась как отношение числа прочтений гена 23S рРНК в анализе РНК-секвенирования к общему числу прочтений, данные представлены в формате среднее \pm стандартное отклонение. Символ (*) указывает на статистически значимое различие (при $p \leq 0,05$) на основе непарного t-критерия Стьюдента

Для картирования сайта, в котором происходит расщепление рРНК в условиях гиперэкспрессии токсина *VarC*, а также для дальнейшего сравнения вариантов расщепления РНК в покоящихся и

гиперэкспрессирующих токсин VarC клетках был проведен анализ методом удлинения праймера. В экстрактах РНК, полученных из клеток *M. smegmatis* штамма wt-pMind-vapC, остановка реакции удлинения была зафиксирована в рамках фрагмента последовательности 23S рРНК между нуклеотидами U2880 и A2881 (рисунок 9, дорожки pMind и VarC). В ходе эксперимента также был выявлен сайт, в котором происходит разрезание молекул 23S рРНК в овоидных покоящихся клетках *M. smegmatis*, и на автордиограмме он совпадает с вышеуказанной точкой, идентифицированной для штамма с гиперэкспрессией VarC (рисунок 9, Акт/Пок, мембраны).

Полученный результат не только является подтверждением гипотезы о VarC-зависимом разрезании молекул 23S рРНК в рамках фрагмента сарцин-рициновой петли, но также демонстрирует сходство между гиперэкспрессирующими токсин VarC и покоящимися клетками *M. smegmatis*.

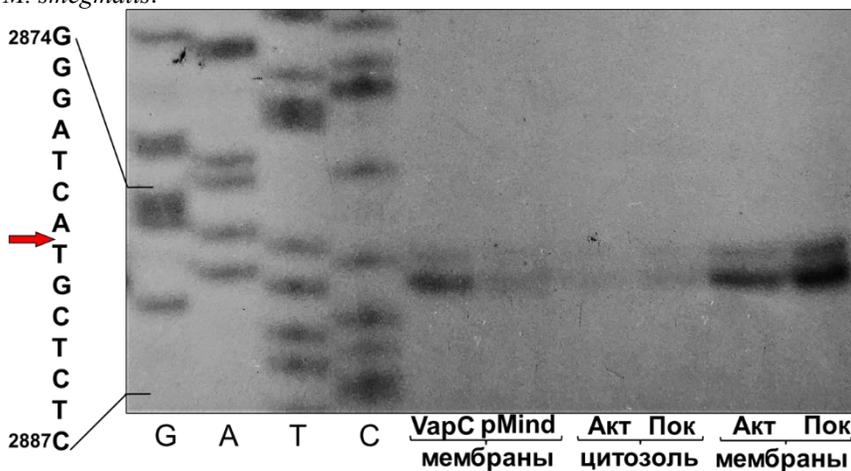


Рисунок 9 – Определение сайта разрезания молекул 23S рРНК в области сарцин-рициновой петли в ходе анализа методом удлинения праймера. Акт – активные клетки штамма дикого типа в поздней экспоненциальной фазе; Пок – покоящиеся клетки штамма дикого типа; pMind – клетки *M. smegmatis* штамма wt-pMind в экспоненциальной фазе; VarC – клетки штамма wt-pMind-vapC в экспоненциальной фазе. G, A, T, C – реакционные смеси для проведения секвенирования по Сэнгеру клонированного фрагмента гена, кодирующего 23S рРНК. Представлена автордиография фрагментов кДНК, полученных из 1 мкг исходного экстракта РНК в ходе обратной транскрипции, меченных изотопом фосфора P³² и разделенных в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Идентифицированный в данной работе участок расщепления сарцин-рициновой петли расположен в 5 нуклеотидах от сайтов разрезания 23S рРНК (между нуклеотидами с координатами G2885 и A2886), выявленных соответственно для токсинов VarC20 и VarC26 у *M. tuberculosis* (Winther *et al.*, 2013; 2016). Данные представлены на рисунке 10.

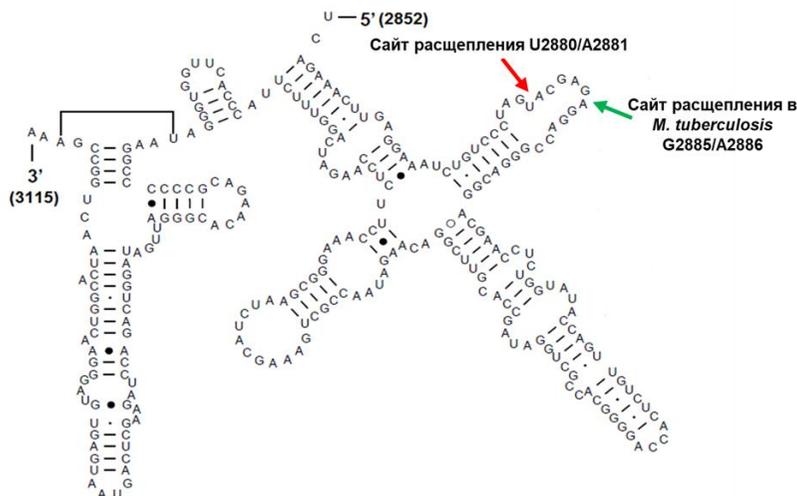


Рисунок 10 – Вторичная структура домена VI 23S рРНК. Сайт расщепления токсином VarC в сарцин-рициновой петле указан красной стрелкой, а сайт разрезания, выявленный для токсина VarC20 у *M. tuberculosis*, отмечен зеленой стрелкой. Данная структура относится к ранее опубликованным (Winther *et al.*, 2013) и взята с сайта The Comparative RNA Web (CRW) (<https://crw-site.chemistry.gatech.edu/>). Нуклеотидная последовательность сарцин-рициновой петли *M. leprae* полностью совпадает с последовательностями *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*

Близость локализации обнаруженного сайта расщепления 23S рРНК токсином VarC в клетках *M. smegmatis* к уже известным участкам разрезания данной молекулы гомологами VarC у возбудителя туберкулёза также указывает на сходство механизмов действия токсинов VarC у двух разных видов микобактерий.

5. Гиперэкспрессия токсина VarC *M. smegmatis* в клетках *M. tuberculosis* приводит к снижению скорости роста культур

Для проверки гипотезы об универсальности механизмов действия токсинов, относящихся к семейству ТА-систем VarBC, в условиях гетерологичной экспрессии белка-токсина микобактерий была осуществлена трансформация клеток *M. tuberculosis* плазмидой рMind со

вставкой гена *varC*, клонированного из хромосомной ДНК клеток *M. smegmatis*. Отобранные трансформанты были пересеяны в жидкую питательную среду, в которой осуществлялось культивирование, сопровождавшееся периодическим измерением оптической плотности (OP_{600}) культур полученного рекомбинантного штамма (МТВ-рMind-*varC*), а также контрольных культур дикого типа, несущих плазмиду рMind без вставки целевого гена (МТВ-рMind). Различия в скорости роста между контрольным и опытным штаммами проявились уже после десяти суток культивирования: на тринадцатые сутки оптическая плотность суспензий штамма МТВ-рMind-*varC* была ниже, чем в контроле в среднем в 4,18 раз (рисунок 11).

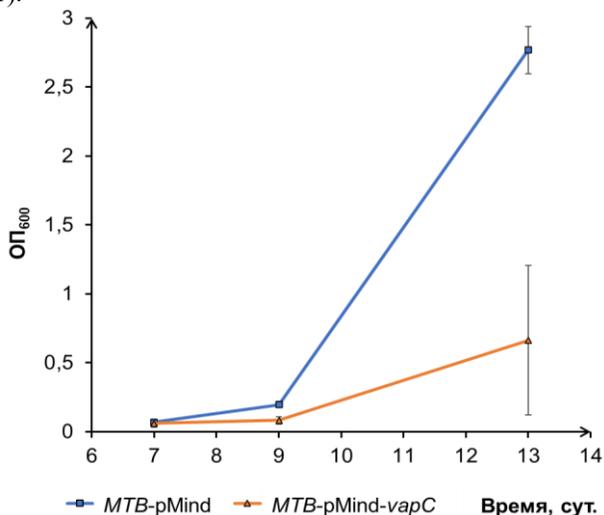


Рисунок 11 – Гиперэкспрессия токсина *VarC* *M. smegmatis* приводит к замедлению роста культуры *M. tuberculosis*

Полученный результат свидетельствует о том, что гетерологичная экспрессия токсина *VarC* в клетках *M. tuberculosis* приводит к формированию нового фенотипа со сниженной скоростью роста, что указывает на функциональность чужеродного токсина в клетках МТВ. Данный факт также подтверждает правомочность использования *M. smegmatis* в качестве модельного организма для изучения ТА-систем *M. tuberculosis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам проведения исследования было установлено, что фенотипическая устойчивость *M. smegmatis* к антибиотикам, подавляющим трансляцию, связана с взаимодействием компонентов токсин-

антитоксिनных систем VarBC и MazEF и обусловлена VarC-зависимым расщеплением 23S рРНК, приводящим к инактивации рибосом, ассоциации их с цитоплазматической мембраной и активации общего стрессового ответа.

ВЫВОДЫ

1. Уровень транскрипции ТА-локусов *varBC* и *mazEF* в клетках *M. smegmatis* возрастает в присутствии тетрациклина, но не меняется при действии изониазида и ципрофлоксацина.

2. Делеция ТА-локуса *varBC* приводит к увеличению чувствительности *M. smegmatis* к тетрациклину, но не к ципрофлоксацину и изониазиду; введение дополнительной делеции по локусу *mazEF* возвращает фенотип к дикому типу.

3. В условиях гиперэкспрессии токсина VarC наблюдается увеличение представленности белков системы общего стрессового ответа и немагистральных путей катаболизма, таких, как глиоксилатный шунт и шунт гамма-аминомасляной кислоты.

4. Гиперэкспрессия токсина VarC приводит к увеличению представленности в мембранной фракции клеток *M. smegmatis* рибосомальных белков и компонентов Sec-комплекса, но вызывает снижение представленности аминоксил-тРНК-синтетаз и факторов элонгации трансляции, что может влиять на чувствительность к антибиотикам, ингибирующим трансляцию.

5. Механизм действия токсина VarC *M. smegmatis* связан с расщеплением сардин-рициновой петли 23S рРНК между нуклеотидами U2880 и A2881, что почти полностью совпадает с мишенью токсина VarC20 *M. tuberculosis*.

6. Гиперэкспрессия VarC *M. smegmatis* в клетках *M. tuberculosis* приводит к снижению скорости роста его культуры, указывая на общность механизмов действия токсинов VarC этих видов микобактерий.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Замахаев М.В.**, Гончаренко А.В., Шумков М.С. Токсин-антитоксिनные системы и бактериальная персистенция (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55. – С. 523-34.

2. **Zamakhaev M.**, Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycolicibacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // *International Journal of Mycobacteriology*. – 2020. – V. 9. No. 2. – P. 138-43.

3. **Zamakhaev M.**, Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Goncharenko A., Shumkov M. VapC toxin switches *M. smegmatis* cells into dormancy through 23S rRNA cleavage // *Archives of Microbiology*. – 2023. – V. 205. No. 1. – P. 28.

4. **Zamakhaev M.**, Bespyatykh J., Goncharenko A., Shumkov M. The Benefits of Toxicity: *M. smegmatis* VapBC TA Module Is Induced by Tetracycline Exposure and Promotes Survival // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11. No. 12. – P. 2863.

Избранные тезисы конференций

1. **Замахаев М.В.**, Гончаренко А.В., Шумков М.С. Роль токсин-антитоксिनных систем в персистообразовании *Mycobacterium smegmatis* в условиях действия тетрациклина. II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов / под редакцией д-ра биол. наук Т.А. Решетиловой. Тула: Изд-во ТулГУ, 2015, с. 43-45.

2. **Замахаев М.В.**, Гончаренко А.В., Шумков М.С. Роль токсин-антитоксिनных систем в формировании фенотипической устойчивости *Mycobacterium smegmatis* к тетрациклину. Программа и научные труды Научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА / Под ред. Е.Н. Ильиной, Е.С. Кострюковой. – М.: ФНКЦ ФХМ ФМБА России, 2016, с. 58-59.

3. **M. Zamakhaev**, J. Bespyatykh, A. Goncharenko, M. Shumkov, “How to turn it off? Role of VapC toxin in mycobacteria dormant state formation”, The FEBS Journal, vol. 284 (Suppl. 1), p. 360, 2017.

4. **Замахаев М.В.**, Шумков М.С. Изучение механизма действия токсина VapC в процессе формирования фенотипически устойчивых клеток *M. smegmatis*. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: 19-25 июня 2017 г.: направление 06.06.01 «Биологические науки» / под редакцией В.О. Попова, К.Г. Скрябина; сост. Е.С. Титова. – Москва: МАКС Пресс, 2017, с. 46-48.

5. **Замахаев М.В.**, Шумков М.С. Гиперэкспрессия VapC приводит к перенаправлению белкового синтеза в клетках *M. smegmatis*. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: 25-28 июня 2018 г.: направление С23 подготовки 06.06.01 «Биологические науки» / под ред. В. О. Попова. К. Г. Скрябина; сост. Е. С. Титова. – Москва: МАКС Пресс. 2018. – с. 54-57.