

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

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

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Шумков М.С.

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Токсин-антитоксиновые системы: функции и классификация.....	18
1.1.1. Классификация ТА-систем.....	20
1.1.1.1. I тип.....	22
1.1.1.2. II тип	23
1.1.1.3. III тип.....	26
1.1.1.4. IV тип.....	27
1.1.1.5. V тип.....	27
1.1.1.6. VI тип.....	28
1.1.1.7. VII тип	28
1.1.1.8. VIII тип.....	30
1.1.2. Функциональная активность токсинов и их мишени.....	31
1.1.2.1. Нарушение репликации ДНК.....	31
1.1.2.2. Повреждение РНК и ингибирование трансляции.....	32
1.1.2.3. Повреждение клеточной стенки и целостности цитоскелета.....	33
1.1.2.4. Вмешательство в центральные метаболические пути и сигналинг.....	34
1.1.3. Физиологические роли ТА-систем.....	35
1.1.3.1. Индукции программируемой клеточной смерти в стрессовых условиях	36
1.1.3.2. Формирование состояний покоя и персистенции	38
1.1.3.3. Защита от «плазмидной зависимости»	42
1.1.3.4. Защита от бактериофагов	43

1.2. Бактериальная персистенция и фенотипическая устойчивость к антибиотикам.....	45
1.2.1. Толерантность и резистентность	47
1.2.2. Толерантность и персистенция	54
1.2.3. Происхождение и сущность персистенции	55
1.2.4. Фенотипическая устойчивость	62
1.3. ТА-локусы как мишени в новых стратегиях борьбы с бактериями....	64
1.3.1. Способы прямой активации ТА-систем.....	66
1.3.1.1. Нарушение или предотвращение образования ТА-комплексов	66
1.3.1.2. Ингибирование биосинтеза молекул антитоксинов и воздействие на мишени токсинов	68
1.3.2. Способы непрямо́й активации ТА-систем.....	69
1.3.2.1. Активация экспрессии протеаз, расщепляющих антитоксины	69
1.3.2.2. Активация ТА-систем с помощью факторов чувства кворума.....	73
1.3.2.3. Индукция стринжент-ответа	72
1.3.3. Инженерия ТА-систем для реализации стратегии целенаправленной гибели клетки.....	73
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	76
2.1. Бактериальные штаммы, среды и условия роста.....	76
2.2. Создание генетических конструкций.....	78
2.3. Определение минимальных ингибирующих концентраций.....	81
2.4. Определение выживаемости в условиях теплового шока, окислительного стресса, действия антибиотиков; измерение НВЧ.....	82
2.5. Фракционирование клеток	83
2.6. Экстракция белка из клеток <i>M. smegmatis</i>	84
2.7. Трипсинолиз белковых экстрактов в геле.....	85
2.8. Анализ ЖХ-МС/МС	86

2.9. Качественный и количественный протеомный анализ	88
2.10. Выделение РНК, электрофорез РНК, секвенирование Illumina.....	89
2.11. Обработка данных РНК-секвенирования	90
2.12. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени.....	90
2.13. Анализ методом удлинения праймера	92
2.14. Статистический анализ.....	93
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	94
3.1. Применение антибиотика способно вызывать активацию экспрессии ТА-локусов.....	95
3.2. Индукция гиперэкспрессии токсинов приводит к разным физиологическим эффектам.....	98
3.3. Протеомное профилирование штамма с гиперэкспрессией VarC демонстрирует изменения белкового состава	100
3.3.1. Анализ геномной онтологии.....	101
3.3.2. Количественный протеомный анализ	104
3.3.2.1. Перераспределение белков, входящих в аппарат трансляции....	107
3.3.2.2. Метаболические перестройки при гиперэкспрессии VarC.....	110
3.4. ТА-система VarBC помогает клеткам избегать действия отдельных стрессовых воздействий	118
3.5. Раскрытие молекулярного механизма активности токсина VarC в клетках <i>M. smegmatis</i>	129
3.5.1. Гиперэкспрессия токсина VarC приводит к нарушению целостности 23S рРНК <i>M. smegmatis</i> в участке сарцин-рициновой петли.....	129
3.5.2. Денатурирующий электрофорез в агарозном геле демонстрирует нарушение целостности 23S рРНК в покоящихся клетках <i>M. smegmatis</i>	132
3.5.3. РНК-секвенирование указывает на нарушение целостности рРНК в покоящихся клетках <i>M. smegmatis</i>	133

3.5.4. Разрыв в 23S рРНК расположен между U2880 и A2881	138
3.6. Гиперэкспрессия токсина <i>VapC M. smegmatis</i> в клетках <i>M. tuberculosis</i> также приводит к снижению скорости роста культур	141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
ВЫВОДЫ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148
ПРИЛОЖЕНИЯ	183
Приложение 1	183
Приложение 2	193
Приложение 3	216

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CHAPS – (англ. 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate hydrate) – 3-(3-холамидопропил) диметиламмоний-1-пропансульфонат гидрат
- CRISPR – (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
- EDF – (англ. environmental death factor) – внеклеточный фактор гибели
- HEPES – (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- HPF – (англ. hibernation promoting factor) – фактор, способствующий гибернации
- MOPS – (англ. 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) – 3-(N-морфолино) пропансульфоновая кислота
- MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
- NB – (англ. nutrient broth) – мясопептонный бульон
- PBS – (англ. phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буферный раствор
- PMSF – (англ. phenylmethanesulfonylfluoride) – фенилметансульфонилфторид
- RRDR – (англ. rifampicin resistance determining region) – область, определяющая устойчивость к рифампицину
- TAE – (англ. tris-acetate-EDTA) – трис-ацетатный буферный раствор
- tet – тетрациклин
- wt – (англ. wild type) – дикий тип

БЦЖ	–	бациллы Кальметта-Герена <i>M. bovis</i>
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ГО (GO)	–	(англ. gene ontology) – геновая онтология
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТТ	–	дитиотреитол
ЖХ-МС	–	жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ИПТГ	–	изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
МБК	–	минимальная бактерицидная концентрация
МИК	–	минимальная ингибирующая концентрация
НВЧ	–	наиболее вероятное число
ОП	–	оптическая плотность
ПНК	–	пептидно-нуклеиновые кислоты
ОТ-ПЦР	–	полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
ТА	–	токсин-антитоксин
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

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 избегать 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 [1]. Известно, что токсин-антитоксиновые (ТА) системы участвуют в формировании покоящихся клеток бактерий. В частности, это показано для системы *VapBC* у *M. smegmatis* [2]. В свою очередь, у МТВ к настоящему времени идентифицировано 79 пар ТА-локусов [3]. Токсины способны расщеплять матричную, транспортную и рибосомальную РНК [4-6], регулировать генную экспрессию, изменяя спектр транслируемых белков [7], участвовать в переходе активных клеток в состояние персистенции [8]. 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 *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 туберкулёзной инфекции.

Степень разработанности темы исследования

Токсин-антитоксиновые (ТА) системы представляют собой двухкомпонентные генетические модули, кодирующие токсин,

ингибирующий рост клеток за счёт нарушения физиологических процессов в клетках, и антитоксин, подавляющий активность токсина, тем самым обеспечивая клеткам протективный эффект от вредного воздействия токсина. Первоначально предполагалось, что ТА-системы только способствуют поддержанию передачи плазмид в популяциях бактерий, убивая дочерние клетки, лишённые ТА-кодирующей плазмиды [9]. Затем ТА-локусы были обнаружены во многих бактериальных и архейных хромосомах, что предполагает наличие альтернативных функций [10]. Так, в геноме *Mycobacterium tuberculosis* (МТВ) в общем насчитывается 79 ТА-локусов, 50 из которых представляют систему VarBC [3].

Несмотря на большую распространённость, физиологическая значимость системы VarBC и конкретные механизмы её участия в регуляции тех или иных физиологических процессов остаются во многом неясными [11]. Доподлинно известно только, что белки, входящие в систему VarBC, являются факторами перехода в покоящееся состояние, но механизм такого перехода не был раскрыт [2, 12]; могут оказывать влияние на формирование симбиоза бактерий с растениями [13] и каким-то образом участвуют в образовании персистеров *S. typhimurium* при инфицировании бактериями клеток эукариот [14]. Помимо этого, повышенная представленность транскриптов ТА-локусов в клетках МТВ со сниженной чувствительностью к антибиотикам позволила предположить их роль в развитии персистенции [15], а возрастание внутриклеточного количества VarC белков в условиях голодания послужило основой идеи об их участии в формировании покоящегося состояния микобактерий [16]. Наблюдаемое при активации VarC замедление синтеза белка и роста бактериальной культуры позволяет говорить о роли этого токсина в формировании стрессового ответа бактериальной клетки, в

особенности, в условиях действия антибиотиков, подавляющих активность рибосом [17].

VarBC относится к ГА-системам второго типа, в которых оба компонента являются белками, и токсин обладает свойствами эндорибонуклеазы [18]. Возможность VarC узнавать и сайт-специфично расщеплять различные РНК достигается за счёт наличия в его молекуле специфического PIN-домена [19]. Хотя мишени большинства VarC-токсинов неизвестны, немногие имеющиеся данные позволяют говорить, что в этом качестве могут выступать транспортные либо рибосомальные РНК. При этом токсины VarC из *Shigella flexnerii*, *Salmonella enterica*, *Leptospira interrogans* и *Haemophilus influenzae* расщепляют «стартовую» fMet-тРНК [4, 20, 21], в то время как микобактериальные (из *M. tuberculosis*) – разрушают прочие тРНК, переносящие цистеин, лейцин, аланин, серин и триптофан [22, 23]. Способность разрезать 23S рРНК показана лишь для двух токсинов VarC-семейства, и оба они микобактериальные: это VarC20 и VarC26 *M. tuberculosis*, которые расщепляют молекулу рРНК в сарцин-рициновой петле [23, 24].

Обзор мишеней токсина VarC позволяет легко заметить тенденцию токсинов этого семейства расщеплять РНК, формирующие структуру аппарата синтеза белка. Исходя из этого, можно предположить, что физиологическая роль VarC заключается не в активации клеточной гибели, как это, предположительно, свойственно токсину MazF [25-27], но состоит в торможении или, даже, перенаправлении белкового синтеза. В пользу этой гипотезы свидетельствует, например, тот факт, что гиперэкспрессия токсина VarC4 *M. tuberculosis*, обеспечивая разрезание специфических тРНК, половинки которых выступают затем в качестве регуляторов активности рибосом [22], вызывает ингибирование трансляции на этапе элонгации

полипептидной цепи и накопление полисом [28], но не гибель бактериальной клетки.

Ещё одним весомым доводом в пользу участия VarBC TA-системы в регуляции клеточных функций является повышение представленности транскриптов некоторых VarBC локусов в клетках МТВ в состоянии покоя [29]. Несмотря на то, что обнаруженный авторами одновременно с этим разрыв молекулы 23S рРНК не совпадал ни с одной из известных мишеней VarC, вполне вероятно, что именно один из этих токсинов ответственен за его появление.

Таким образом, физиологические функции VarBC определяют переход бактериальных клеток в состояние низкой метаболической активности (либо персистенции, либо покоя) и ограниченную чувствительность к антибиотикам. Эти роли реализуются за счет расщепления стабильных РНК, участвующих в синтезе белка, что, по-видимому, вызывает перепрограммирование протеома.

В качестве модельного объекта при исследовании физиологии микобактерий нередко используется родственная МТВ непатогенная бактерия *M. smegmatis*. Её геном в 1,5 раза больше генома МТВ, но несёт только 4 TA-локуса, хотя исследования последних лет свидетельствуют о наличии пятого TA-локуса [30]. Вероятно, множественность TA-систем необходима МТВ для тонкой настройки стрессового ответа и преодоления негативного влияния систем защиты макроорганизма от колонизации его патогенами. Вместе с тем, такое разнообразие, почти наверняка подразумевает, с одной стороны, узкую специализацию отдельных представителей VarBC семейства, а с другой – дублирование разными его представителями одних и тех же функций. Отсюда очевидно, что ключевые функции VarBC, по-видимому, необходимо исследовать на бактериях с единичными TA-системами такого типа, поскольку в этом случае одна TA-пара должна оказывать влияние на все

основные мишени (или на главную из них). С этих позиций изучение физиологической роли VarBC *M. smegmatis* становится важнейшей отправной точкой понимания участия системы VarBC в регуляции клеточных функций МТВ и приобретает особую значимость в свете подтверждённого участия VarC *M. smegmatis* в формировании покоящегося состояния микобактерий [2].

Цель и задачи исследования

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* [22-24, 31]. 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 *VapC* 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 и 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 антибактериальных препаратов.

Принимая во внимание накопленные за годы исследований данные об участии ТА-систем в широком спектре физиологических процессов у бактерий, таких как развитие стрессового ответа, индукция состояния персистенции и образования биоплёнок, а также связь активности модуля *VapBC* с вирулентностью микроорганизмов [32] 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 *varBC* 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-антитоксиновых 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 аминоксил-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

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 также 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 введение, обзор литературы, раздел с описанием материалов и методов, результаты и их обсуждение, заключение, список используемых источников и приложения.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Токсин-антитоксिनные системы: функции и классификация

Системы токсин-антитоксин (ТА) были открыты в 1980-х годах как двухкомпонентные модули, способствовавшие поддержанию конъюгативных плазмид в бактериальных популяциях [33, 34]. Подробное изучение двух таких модулей, кодируемых плазмидами R1 и F, привело к созданию модели «постсегрегационной гибели», подразумевающей способность токсин-антитоксिनных систем вызывать элиминацию клеток, не содержащих копию плазмиды [33, 34]. Поскольку выживание клеток в данной модели зависит от наличия генов ТА-систем, это явление стало широко известно как «плазмидная зависимость» [35]. Несмотря на то, что два вышеупомянутых модуля реализовывали один и тот же тип постсегрегационной гибели клеток, регуляция и функциональность данных систем, по-видимому, осуществлялась за счёт разных молекулярных механизмов. В случае локуса *ccdAB*, расположенного на F-плазмиде, оба продукта экспрессии представляли собой белки, и экспрессия только гена токсина *ccdB* приводила к филаментации клеток, развитию SOS-ответа и индукции λ -профага [36–38]. Позднее было показано, что белок-антитоксин CcdA образует комплекс с токсином CcdB, ингибируя тем самым его токсическую активность [39]. В то же время, экспрессия токсина *hok* из системы *hok-sok* в составе плазмиды R1 приводила к изменению морфологии клеток вследствие влияния на проницаемость клеточной мембраны [34, 40]. В отличие от системы *ccdAB*, предотвращение Нок-индуцированной токсичности основывалось на активности антисмысловой РНК, комплементарной мРНК *hok* и ингибирующей трансляцию Нок-токсина [41]. Эти открытия дали предпосылки и определили первые два типа ТА-систем: тип I (*hok-sok*) и тип II (*ccd*). Феномен постсегрегационной гибели в обоих случаях был основан на различиях в

стабильности антитоксинов и токсинов: белки-токсины были стабильны, тогда как белки-антитоксины или РНК характеризовались нестабильностью [41–43]. При потере плазмиды молекулы антитоксинов подвергались разрушению, а токсины продолжали продуцироваться (тип I) или высвобождаться из комплексов антитоксин-токсин (тип II), что приводило к гибели клеток, не несущих плазмиды.

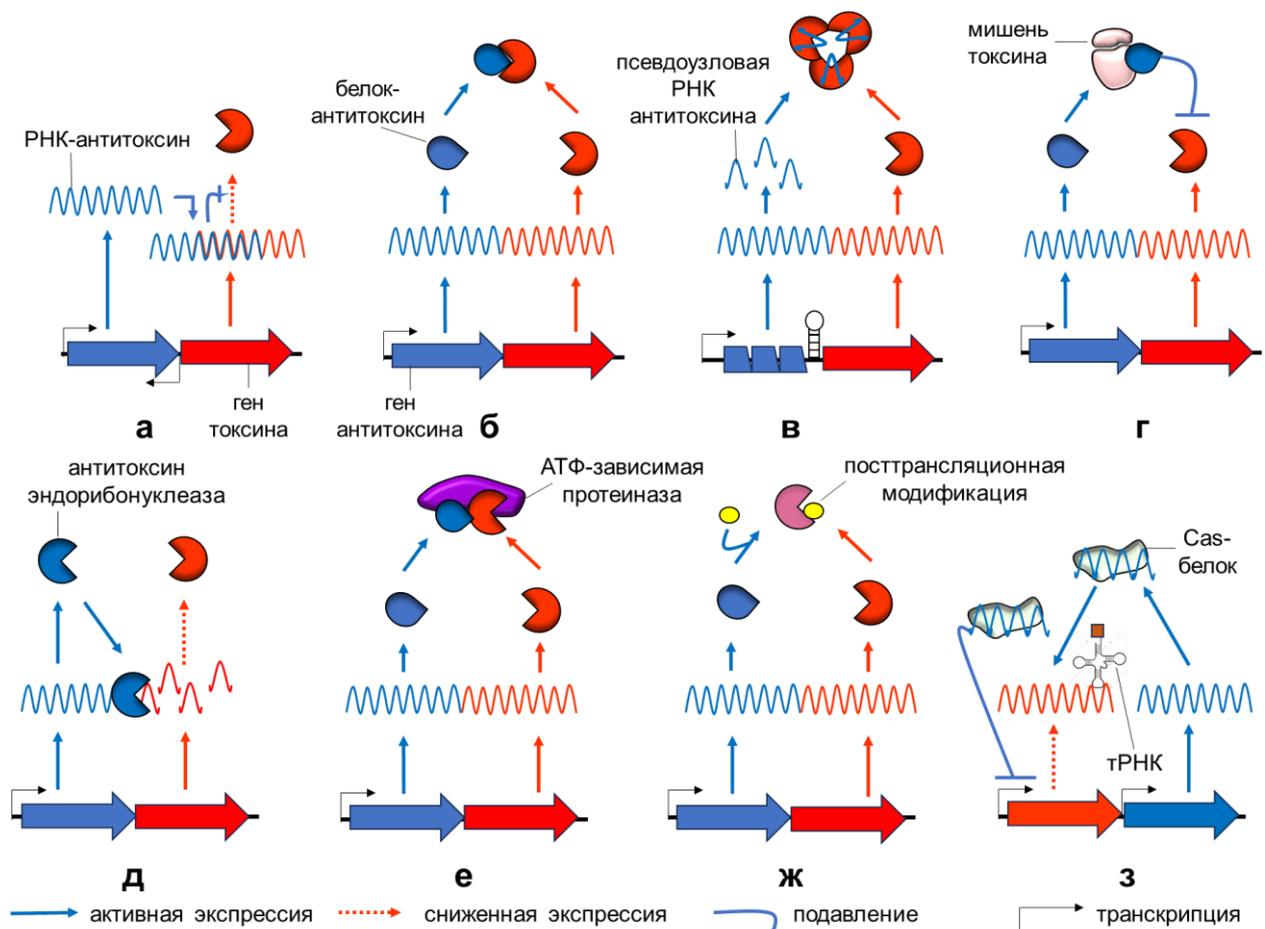
С течением времени были открыты и охарактеризованы другие кодируемые плазмидами ТА-локусы. Неожиданно гомологи этих систем были найдены и в хромосоме *Escherichia coli* [44–46]. С расширением возможностей секвенирования бактериальных геномов было обнаружено, что хромосомные ТА-системы далеко не редкость, причем часто в одном репликоне обнаруживается множество их копий [10, 47–49]. В хромосомах системы токсин-антитоксин расположены преимущественно в геномных островках (профагах, интегративных и конъюгативных элементах или транспозонах) или сами по себе образуют небольшие геномные островки [47, 50, 51]. Со временем были открыты новые типы ТА-систем с различными способами регуляции и новыми механизмами токсичности [52–60]. Хотя функции кодируемых плазмидами ТА-модулей остаются неизменны, роли, предложенные для их хромосомных аналогов, иногда остаются противоречивыми. Они включают в себя запрограммированную клеточную смерть, адаптацию к стрессовым условиям и регуляцию выживаемости в условиях действия антибиотиков. Недавние открытия в этой области предлагают альтернативные взгляды на роли и функции этих очень распространенных элементов в контексте эволюции генома. Несмотря на противоречия относительно функций ТА-систем, последние несколько десятилетий привели к существенному прогрессу в плане открытия и подробной характеристики новых механизмов действия токсинов и способов

подавления токсичности, что значительно расширило число семейств токсинов и антитоксинов и их возможных комбинаций [52–60]. Исследования молекулярных структур пролили свет на эволюционные связи между токсинами с различной активностью [61–64]; более того, было обнаружено разнообразие конформаций и вариабельность стабильности молекул антитоксинов даже внутри одного семейства [65–67]. В конечном итоге было показано структурное сходство между некоторыми ТА-семействами и, например, системами, участвующими в клеточной секреции и защите [68, 69].

1.1.1. Классификация ТА-систем

Двухкомпонентный состав токсин-антитоксиновых локусов характеризуется наличием гена токсина и гена родственного ему антитоксина. Гены, кодирующие оба компонента, экспрессируются совместно и, как правило, имеют оперонную организацию (за исключением ТА-систем I и VIII типа). Подавляющее большинство идентифицированных к настоящему времени токсинов представляют собой белковые молекулы, за исключением недавно открытых систем VIII типа, в которых токсины являются молекулами РНК. В свою очередь, антитоксины по своей природе – это либо белки, либо молекулы РНК, способные инактивировать токсины, путем ингибирования их трансляции, образования неактивного комплекса, либо влияя на стабильность молекул токсинов.

В настоящее время ТА-системы подразделяются на восемь (I–VIII) типов, причем порядковые номера, соответствующие типам ТА-систем, присваивались хронологически по мере открытия новых механизмов ингибирования активности токсинов молекулами антитоксинов. Особенности ТА-модулей каждого типа кратко обсуждаются далее по тексту. Также отличия между разными типами ТА-систем схематически отображены на рисунке 1.



(а) в ТА-системах I типа РНК антитоксина (обозначена синим) связывается с мРНК токсина (выделена красным) и блокирует его трансляцию; (б) у ТА-систем II типа белок-антитоксин взаимодействует с белком-токсином, образуя неактивный комплекс; (в) для систем III типа характерно связывание антитоксина РНК с белком-токсином с последующим ингибированием его активности; (г) IV тип ТА-систем примечателен тем, что белок-антитоксин связывается с субстратом белка-токсина и косвенно ингибирует активность последнего; (д) в случае ТА-систем V типа белок-антитоксин расщепляет мРНК токсина и ингибирует его трансляцию; (е) в системах VI типа белок-антитоксин взаимодействует с белком-токсином и действует как протеолитический адаптер для деградации токсина протеазами; (ж) в системах VII типа белок-антитоксин взаимодействует с белком-токсином и ингибирует активность токсина посредством посттрансляционной модификации токсина; (з) ТА-системы VIII типа кодируют РНК-антитоксины, которые участвуют в транскрипционной репрессии экспрессии РНК-токсина.

Пример, показанный на этом рисунке, основан на модуле *creT-creA*
 Рисунок 1 – восемь типов ТА-систем, выделенных по способу ингибирования активности токсина антитоксином

1.1.1.1. I тип

Известно, что гены ТА-локусов I типа устроены либо как перекрывающиеся конвергентно транскрибируемые пары генов, либо как дивергентно транскрибируемые гены, расположенные отдельно [70, 71]. При этом токсин-антитоксиновая пара генов кодирует токсинный полипептид и антитоксиновую РНК. За исключением токсинов *SymE* и *RalR*, где *SymE* – РНК-эндонуклеаза [72], а *RalR* – ДНК-эндонуклеаза [73], в основном токсины данного типа представляют собой небольшие гидрофобные белки и действуют как литические пептиды. Гиперэкспрессия токсина вызывает остановку роста или гибель клеток за счет образования пор в мембране, что приводит к ее распаду или потере мембранного потенциала [40, 74–78], в свою очередь, вызывая сокращение запаса АТФ с негативными последствиями для репликации, транскрипции и трансляции [79]. Например, гиперэкспрессия токсинов *hok*, *relF*, *srrnB*, *pndA*, *fst*, *ibsC*, *shoB*, *tisB* и *dinQ* вызывает истощение мембранного потенциала или разрушение самой мембраны, что приводит к гибели клеток [40, 74–78]. Распад мембран приводит к образованию «клеток-призраков» (лизированных клеток с повреждённой мембраной) и, в конечном итоге, к гибели клеток [40]. В то же время, экспрессия антитоксина предотвращает вышеописанные эффекты: антитоксин ингибирует активность токсина либо путем ингибирования трансляции мРНК токсина, либо путем стимулирования её деградации. Чтобы ингибировать трансляцию мРНК токсина, антитоксин может действовать несколькими способами. Например, в системе *symE-symR* у *Escherichia coli* антитоксин связывается с перекрывающейся областью сайта связывания рибосом мРНК токсина и предотвращает прямое связывание рибосом [72]. В ТА-системах *hok-sok* и *ldrD-rdlD* в клетках *E. coli* антитоксиновая РНК также связывается с последовательностью Шайна-Дальгарно, однако нацелена на мРНК,

кодирующую лидерный пептид, который трансляционно связан с токсином, что косвенно ингибирует экспрессию последнего [80, 81]. В ТА-системах *E. coli* *tisB1-istR1* и *zorO-orzO* антитоксина РНК связывается с 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR) и ингибирует трансляцию токсина [82, 83]. В ТА-системе *Enterococcus faecalis* *RNAI-RNAII* РНК токсина и антитоксина взаимодействуют друг с другом и образуют частичную дуплексную структуру, что приводит к ингибированию трансляции токсина [84]. Таким образом, в случае деградации мРНК токсина, опосредованной антитоксином, РНК как токсина, так и антитоксина образуют дуплекс, который расщепляется РНКазой III. Например, в системе *tXpA-ratA Bacillus subtilis* антитоксина РНК взаимодействует с токсинной РНК посредством спаривания оснований и образует дуплекс. Расщепление дуплекса РНКазой III приводит к деградации обеих РНК [85]. В ТА-модуле *bsrG-SR4 B. subtilis* антитоксина РНК перекрывается с 3'-концом токсина и образует дуплекс. Расщепление дуплекса РНКазой III в нижнем положении сопровождается полной деградацией обеих РНК эндонуклеазой Y и 3'-5' экзорибонуклеазой R [85]. Интересно, что антитоксина РНК SR4 является бифункциональной, поскольку она ингибирует трансляцию мРНК токсина путем формирования дуплекса РНК с мРНК токсина, а также путем индукции изменения конформации в области сайта связывания токсина с рибосомой, что препятствует их соединению [86].

1.1.1.2. II тип

Среди всех ТА-локусов системы II типа являются наиболее изученными. Они многочисленны и часто существуют в виде нескольких копий в хромосомах. Также они, как правило, организованы в опероны и транскрипционно связаны. И токсин, и антитоксин в системах данного типа

являются белковыми молекулами. Гиперэкспрессия токсина может вызывать остановку роста, нарушая процессы репликации, трансляции, синтеза компонентов клеточной стенки или промежуточных метаболитов [87]. В настоящее время токсины типа II разделены на девять суперсемейств на основе их структурных характеристик: ParE/RelE, MazF, HicA, VapC, HipA, FicT/Doc, AtaT/TacT, ζ и MbcT [88] (таблица 1).

Таблица 1 – девять суперсемейств токсинов в составе II типа ГА-систем

№	Семейство	Токсины	Активность	Нарушаемый процесс
1	ParE/RelE	ParE RelE, HigB, YoeB, YafQ, MqsR, YafO	Ингибирование ДНК-гиразы Рибосомо-зависимое расщепление мРНК	Репликация Трансляция
2	MazF	MazF, YdcE, PemK, ChpBK CcdB	Расщепление мРНК, рРНК и тРНК Ингибирование ДНК-гиразы	Трансляция Репликация
3	HicA	HicA	Расщепление мРНК	Трансляция
4	VapC	VapC, PhoH2	Расщепление тРНК, рРНК	Трансляция
5	HipA	HipA, HipT	Фосфорилирование аминоацил тРНК-синтетаз	Трансляция
6	FicT/Doc	FicT Doc	Аденилирование ДНК- гиразы и топоизомеразы IV Фосфорилирование фактора элонгации трансляции EF-Tu	Репликация Трансляция
7	AtaT/TacT	AtaT, TacT	Ацетилирование аминоацил- тРНК-синтетаз	Трансляция
8	ζ (Зета)	ζ , PezT, EzeT	Фосфорилирование предшественника пептидогликана УДФ-N- ацетилглюкозамина	Биосинтез компонентов клеточной стенки
9	MbcT	MbcT	Фосфорилирование НАД ⁺	Энергетический метаболизм

Токсины, принадлежащие к одному семейству, иногда могут иметь разный механизм действия. Например, токсин ParE действует на ДНК-гиразу,

вызывая накопление разрывов ДНК [89], тогда как RelE проявляет рибосомозависимую мРНК-эндонуклеазную активность [90]. MazF представляет собой эндонуклеазу, расщепляющую РНК, включая мРНК [91], рРНК [92] и тРНК [93], в то время как вышеупомянутый токсин CcdB также действует как ингибитор гиразы [94]. HicA обладает эндонуклеазной активностью и расщепляет мРНК [95]. Токсин VarC содержит типичную структуру PIN-домена и расщепляет различные тРНК, включая тРНК^{fMet}, тРНК^{Leu}, тРНК^{Ser}, тРНК^{Trp}, а также 23S рРНК [23, 96, 97]. HipA и HipT действуют как киназы, которые фосфорилирует глутамил-тРНК-синтетазу и триптофанил-тРНК-синтетазу соответственно [98, 99]. Dps представляет собой киназу, фосфорилирующую фактор элонгации трансляции EF-Tu, что приводит к неспособности EF-Tu связывать аминокислотированные тРНК [63]. FicT аденилирует ДНК-гиразу и топоизомеразу IV в их сайтах связывания с АТФ [64, 100]. AtaT и TacT действуют оба как ацетилтрансферазы, где AtaT эффективно ацетирует изоакцепторы Gly-тРНК^{Gly}, Trp-тРНК^{Trp}, Tyr-тРНК^{Tyr} и Phe-тРНК^{Phe} в дополнение к Met-тРНК^{fMet} [101, 102], а TacT ацетирует Gly-тРНК^{Gly}, Trp-тРНК^{Trp}, Leu-тРНК^{Leu} и Ser-тРНК^{Ser} [103]. Зета (ζ) токсин системы ϵ - ζ представляет собой УДФ-N-ацетилглюкозаминкиназу, вызывающую ингибирование биосинтеза клеточной стенки [104]. MbcT с его АДФ-рибозилтрансферазной активностью истощает внутриклеточный запас НАД⁺ [55]. Интересно, что PhoH2 и EzeT бифункциональны: N-конец PhoH2 состоит из PIN-домена с рибонуклеазной активностью, тогда как C-конец содержит РНК-хеликазный домен [105], чья активность связана с раскручиванием и облегчением расщепления РНК. Тогда как в случае EzeT C-концевой домен катализирует фосфорилирование УДФ-N-ацетилглюкозамина, в то время как N-концевой домен сильно ослабляет киназную активность и удерживает EzeT в аутоингибированном состоянии [106].

В целом, токсины представляют собой РНКазы, киназы и ацетилтрансферазы, которые при гиперэкспрессии останавливают рост клеток. Антитоксины – также представляющие собой белковые молекулы – связываются с активными участками родственного им токсина и ингибируют его активность [107, 108]. Например, MazE связывается с активным центром родственного токсина MazF и нейтрализует его рибонуклеазную активность [109]. Связывание антитоксина RelB с родственным ему токсином RelE приводит к смещению С-концевой области, необходимой для реализации ферментативной активности токсина [110]. Эпсилон (ϵ) антитоксин и PezA создают стерические препятствия для сайтов связывания АТФ/ГТФ и таким образом ингибируют активность родственных им токсинов [104, 111]. Лишь немногие антитоксины ингибируют активность токсинов, не блокируя их активные центры. Например, антитоксин HipB ингибирует родственный ему токсин HipA, способствуя поддержанию его в неактивном состоянии [112]. В случае ТА-систем *mqsR-mqsA* и *higB-higA* антитоксин связывается со специфическим сайтом, не совпадающим с активным центром токсина, но ингибирует его активность [108, 113].

1.1.1.3. III тип

Токсин-антитоксиновые модули III типа организованы в опероны, в которых оба гена разделены слабым терминатором транскрипции. Оперон кодирует белок-токсин и РНК-антитоксин. До сих пор идентифицировано очень мало ТА-систем данного типа: первой описанной из них является локус *toxN-toxI* у *Erwinia carotovora* [52], а второй — система *abiQ-antiQ* в клетках *Lactococcus lactis* [114]. ТА-оперон кодирует полноразмерную РНК антитоксина (РНК-предшественник), состоящую из повторов небольших нуклеотидных последовательностей, и белок-токсин. В условиях

гиперэкспрессии токсина наблюдается бактериостатический эффект; кроме того, была показана роль данного ТА-модуля в защите бактерий от фаговых инфекций [52, 115]. Токсин представляет собой сайт-специфичную эндорибонуклеазу, которая расщепляет повторяющиеся последовательности РНК-предшественников антитоксина на отдельные псевдоузловые РНК-фрагменты [116]. Псевдоузловые структуры представляют собой форму компактизации РНК, в которой активные для взаимодействия с другими молекулами участки остаются доступными [117, 118]. Такие фрагменты РНК антитоксина связываются с молекулами токсина и образуют с ним неактивный комплекс [116].

1.1.1.4. IV тип

ТА-системы IV типа представлены в виде оперонов, кодирующих как токсин, так и антитоксин в белковой форме. На сегодняшний день обнаружено лишь несколько ТА-систем, относящихся к данному типу: первой идентифицированной из них является система *cbtA-cbeA*, а также два гомологичных модуля *ukfI-yafW* и *ypjF-yjfZ* были идентифицированы в клетках *E. coli*. Токсин CbtA оказывает токсическое действие путем ингибирования полимеризации цитоскелетных белков FtsZ и MreB, что приводит к изменению морфологии клеток и, как следствие, тормозит деление и вызывает остановку клеточного роста. Антитоксин CbeA не взаимодействует с токсином для инактивации, но косвенно ингибирует действие токсина за счет усиления связывания цитоскелетных полимерных белков MreB и FtsZ [119].

1.1.1.5. V тип

К текущему моменту была описана лишь одна ТА-система V типа – это локус *ghoT-ghoS* в клетках *E. coli*. Модуль *ghoT-ghoS* существует в виде

оперона, который кодирует токсин GhoT и антитоксин GhoS, где токсин GhoT — литический пептид, убивающий клетки в отсутствие антитоксина. Антитоксин GhoS предотвращает токсичность, опосредованную GhoT, путем расщепления мРНК *ghoT* и ингибирования её трансляции [53, 120].

1.1.1.6. VI тип

Единственная изученная на сегодняшний день ТА-система VI типа – *socB-socA* у *Caulobacter crescentus* [54]. Модуль *socB-socA* имеет оперонную организацию, но в отличие от большинства ТА-систем, токсин SocB нестабилен и чувствителен к протеазе ClpXP, тогда как антитоксин SocA действует как протеолитический адаптер для деградации SocB. Связываясь с токсином SocB, антитоксин SocA осуществляет доставку молекул SocB к протеазам для последующей деградации. SocB оказывает токсическое действие путем ингибирования элонгации репликации ДНК посредством прямого взаимодействия с DnaN. DnaN представляет собой бета-белок скользящего зажима, который образует кольцо вокруг двуцепочечной ДНК. Во время репликации DnaN связывается с ДНК-полимеразой III и увеличивает ее процессивность [121, 122]. SocB конкурирует с РНК-полимеразой III за связывание с DnaN и нарушает синтез обеих цепей, что приводит к остановке репликативной вилки [54].

1.1.1.7. VII тип

Для ТА-систем VII типа также характерна представленность в виде оперонов, а токсин и антитоксин существуют в белковой форме. Гиперэкспрессия токсина вызывает остановку роста, а его инактивация достигается за счет антитоксин-опосредованной посттрансляционной модификации, такой как фосфорилирование, окисление или присоединение

АМФ. К настоящему времени идентифицированы три семейства ТА-систем VII типа: *tgIT-takA/menT3-menA3*, *hha-tomB* и *HEPN-MNT*. *tgIT-takA/menT3-menA3* (*Rv1044-Rv1045*) в клетках *Mycobacterium tuberculosis* кодирует токсин TgIT/MenT3, представляющий собой нуклеотидилтрансферазу [56, 123], и антитоксин TakA/MenA3, являющийся сериновой протеинкиназой [123]. TgIT/MenT3 ингибирует синтез белка, предотвращая связывание тРНК с соответствующими аминокислотами, в первую очередь тРНК^{Ser}, путем присоединения пиримидиновых, а не пуриновых нуклеотидов к акцепторным стеблям 3'-ССА свободных тРНК [56]. Антитоксин TakA/MenA3 взаимодействует с TgIT/MenT3 [56, 123] и инактивирует его путем фосфорилирования TgIT [123]. Другая ТА-система *E. coli hha-tomB* в условиях гиперэкспрессии токсина Hha вызывает бактериолитический эффект вследствие подавления редких тРНК, что приводит к угнетению трансляции, индукции протеаз и активации литических криптических генов профагов [124]. Окисление Hha, опосредованное антитоксином TomB, вызывает изменение структуры токсина Hha, что приводит к его инактивации [125]. Третья ТА-система, *HEPN-MNT*, существует в виде оперона и кодирует белок-токсин HEPN и белок-антитоксин MNT [126]. Токсин HEPN действует как рибонуклеаза, которая расщепляет мРНК и тРНК, тем самым влияя на трансляцию. Интересно, что у *Shewanella oneidensis* токсин HEPN расщепляет мРНК, а не тРНК или рРНК, тогда как у *Aphanizomenon flos-aquae* HEPN расщепляет тРНК по определенным сайтам, а не мРНК или рРНК [127]. MNT инактивирует HEPN путем присоединения двух остатков АМФ в клетках *A. flos-aquae* и трёх остатков АМФ в случае *S. oneidensis* [58, 128].

1.1.1.8. VIII тип

ТА-модули VIII типа кодируют как токсин, так и антитоксин в форме РНК. На сегодняшний день известно только о двух ТА системах типа VIII – *creT-creA* в *Haloarcula hispanica* и *sdsR-ryeA* в *E. coli*. Интересно, что система *creT-creA* встроена в различные локусы CRISPR-Cas, где каскад CRISPR регулирует транскрипцию данного модуля. Система *creT-creA* состоит из токсина CreT (каскадно-репрессируемый токсин) и антитоксина CreA (РНК CRISPR, напоминающая РНК антитоксина). Экспрессия CreT вызывает бактериостатический эффект путем секвестрации редкой тРНК^{Arg}, что приводит к нарушению трансляции некоторых жизненно важных генов и тем самым вызывает остановку роста. CreA имитирует РНК CRISPR и каскадно ингибирует транскрипцию CreT. CreA требует Cas6 для созревания, поэтому CreA приобретает антитоксическую активность только при наличии данного каскада. РНК *creA* и промотор *creT* обладают частичной комплементарностью, что позволяет управлять каскадом остановки транскрипции *creT*. Система *creT-creA* образует с CRISPR своеобразный молекулярный симбиоз, вызывая у хозяина зависимость от CRISPR [60]. Другая ТА-система, *sdsR-ryeA* *E. coli*, кодирует малую РНК токсина *sdsR* и РНК антитоксина *ryeA*, которые транскрибируются с противоположных цепей. Экспрессия *sdsR* вызывает Hfq-зависимую гибель клеток. SdsR регулирует экспрессию многих генов, включая *yhcB* – белок внутренней мембраны, подавление которого с помощью SdsR приводит к бактерицидному эффекту. Чтобы противостоять токсическому эффекту SdsR, RyeA взаимодействует с SdsR посредством спаривания оснований и перекрывает весь SdsR, что приводит к деградации обеих РНК под действием РНКазы III [129].

1.1.2. Функциональная активность токсинов и их мишени

Как уже было сказано, классификация ТА-систем по типам основана на способе ингибирования активности токсина антитоксином. В текущем разделе ТА-локусы будут рассмотрены с позиций молекулярных механизмов влияния токсинов на те или иные внутриклеточные процессы.

1.1.2.1. Нарушение репликации ДНК

Одним из механизмов действия токсинов является вмешательство в процесс репликации ДНК. Так, мишенью токсина CcdB, как было упомянуто ранее, является ДНК-гираза, а именно её субъединица GyrA: ингибируя этап повторного лигирования ДНК в процессе ферментативного цикла, осуществляемого ДНК-гиразой, CcdB блокирует фермент на ДНК в составе так называемого расщепленного комплекса, что напоминает по молекулярному механизму принцип действия антибиотиков из класса фторхинолонов. Считается, что активность CcdB индуцирует остановку репликативных вилок, что приводит к двухцепочечным разрывам ДНК, индукции SOS-ответа и гибели клеток [94, 130, 131]. Экспрессия токсина ParE также индуцирует SOS-ответ, хотя этот токсин структурно не родственен CcdB [89, 132, 133]. Остается неясным, подобен ли молекулярный механизм, лежащий в основе токсичности ParE, механизму действия CcdB, поскольку штамм *E. coli* с мутацией GyrA₄₆₂ устойчив к действию CcdB, но при этом сохраняет чувствительность к ParE [131, 134]. Токсины из семейства Fic аденилируют ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, что ингибирует их гидролизную активность по отношению к АТФ и приводит к приостановке декатенации и репликации ДНК [64].

Было показано, что в отличие от вышеупомянутых токсинов, действующих на ДНК-гиразу, некоторые токсины воздействуют на ДНК напрямую. Например, токсин DarT (IV тип) представляет собой АДФ-

рибозилтрансферазу, которая переносит остаток АДФ-рибозы с молекул НАД⁺ на одноцепочечную ДНК, вызывая повреждение ДНК и индуцируя SOS-ответ [135]. Токсин RalR (I тип) является неспецифической ДНКазой, которая расщепляет как метилированную, так и неметилованную ДНК [73]. Наконец, к этой группе также относится токсин SocB (VI тип), поскольку нарушает процессивность репликации ДНК за счет прямого взаимодействия со скользящим β -зажимом ДНК-полимеразы [54].

1.1.2.2. Повреждение РНК и ингибирование трансляции

Процессы биосинтеза белка, по-видимому, являются основной мишенью для токсинов II типа [136]. Многие из них представляют собой рибонуклеазы с различной степенью специфичности. Она может быть как низкой: например, токсины семейства MazF расщепляют свободные клеточные РНК, воздействуя на мРНК, а также на предшественников рибосомальных РНК [92, 137, 138]), так и высокой: в частности, было показано, что некоторые токсины MazF специфичны по отношению к отдельным видам тРНК [139]. Интересно, что токсины III типа ToxN похожи по структуре на токсины семейства MazF, и также было показано, что они разрушают свободные мРНК [114–116]. В то же время, токсины из семейства VarC специфически расщепляют антикодонные петли различных целевых тРНК [4, 22, 23, 140], а также Сарцин-рициновую петлю 23S рРНК, которая демонстрирует структурное сходство с антикодонными стволовыми петлями тРНК [23, 24]. RelE и родственные ему токсины котрансляционно расщепляют мРНК, действуя на сайт А рибосом. Расщепление обычно происходит между вторым и третьим положениями целевых кодонов [90, 141, 142]. Токсины рода HicA также проявляют рибонуклеазную активность, хотя их субстратная специфичность еще не изучена [143].

Помимо непосредственного повреждения РНК, разнообразные токсины II типа влияют на функциональность тРНК посредством посттрансляционных модификаций факторов, осуществляющих процессинг тРНК, или модифицируя сами тРНК. Токсин HcrA специфически фосфорилирует аминоксил-тРНК-синтетазу и, следовательно, ингибирует присоединение аминокислотных остатков к специфическим тРНК [98, 99]. Напротив, токсин Dос фосфорилирует и инактивирует фактор элонгации Tu (EF-Tu), тем самым ингибируя процесс презентации тРНК транслирующей рибосоме [63]. Интересно, что токсин Dос обладает Fic-доменом, аналогично ферментам, мишенью которых являются топоизомеразы, но использует инвертированный субстрат для переноса фосфатной группы вместо фрагмента АМФ [63]. Токсины GNAT-ацетилтрансферазы инактивируют тРНК путем ацетилирования аминокислотных остатков, ассоциированных со специфическими тРНК [101, 144, 145]. Недавно охарактеризованный токсин FaRel2 семейства ToxSAS (токсичная малая алармонсинтетаза) переносит пирофосфатный остаток от АТФ к ССА-концу акцепторных стеблей тРНК, тем самым нарушая их аминокислотирование [59]. Токсины VII типа также угнетают функции тРНК либо путем лигирования пиримидинов с акцепторными стеблями, что предотвращает связывание тРНК с аминокислотами (как в случае токсина MenT) [56], либо путем непосредственного расщепления акцепторного стебля тРНК в случае токсинов NEPN [58]. Недавно описанный токсин CreT VIII типа изолирует редкие тРНК и, следовательно, также вызывает остановку роста [60].

1.1.2.3. Повреждение клеточной стенки и целостности цитоскелета

Наименьшими по молекулярной массе из известных токсинов являются односпиральные трансмембранные пептиды – обычно кодируемые TA-

системами I типа – такие как Hok, TisB, Lsr, DinQ и Fst. Для большинства из них было показано, что при интеграции во внутреннюю мембрану они вызывают её деполяризацию, нарушая электрохимический протонный градиент [34, 40, 77, 78, 146]. Также известно, что некоторые из них препятствуют делению клеток, вызывая конденсацию хромосомы [147, 148]. Кроме того, предполагается, что токсин GhoT (V типа) представляет собой двуспиральный белок, встраивающийся в мембрану, а его гиперэкспрессия приводит к образованию клеток с изменённой морфологией, аналогичных тем, что возникают в результате действия токсинов из ТА-систем I типа [53]. Среди ТА-систем II типа ζ -токсин известен своей способностью ингибировать биосинтез пептидогликана и липополисахаридов клеточной стенки бактерий за счёт истощения УДФ-активированных сахаров посредством их фосфорилирования, что приводит к потере клеточной стенкой своей целостности [149, 150]. Наконец, было показано, что токсин CbtA IV типа ингибирует деление клеток, предотвращая полимеризацию белков бактериального цитоскелета MreB и FtsZ, путём непосредственного с ними взаимодействия [119, 151].

1.1.2.4. Вмешательство в центральные метаболические пути и сигналинг

Некоторые недавно описанные токсины катализируют разложение или биосинтез низкомолекулярных метаболитов, что может вызывать метаболический стресс и подавлять важнейшие клеточные функции. Например, токсин II типа MbcT гидролизует и истощает запасы НАД⁺ - центрального переносчика электронов, необходимого для окислительно-восстановительных реакций [55]. Подсемейство токсинов ToxSAS (FaRel) из систем типа II и типа IV обладает Rel-подобным (p)ppGpp-синтазным доменом

и истощает внутриклеточные запасы ГТФ/ГДФ и АТФ/АДФ путем пирофосфорилирования, что приводит к накоплению сигнальных молекул (p)ppGpp и (p)ppApp, участвующих в запуске стрессового ответа [57]. Таким образом, молекулярные механизмы токсического действия ТА-систем не менее разнообразны, чем способы ингибирования токсинов антитоксинами. Однако общим свойством всех токсинов является их способность подавлять основные клеточные функции, нарушение которых, приводит к гибели бактерий или, как минимум, остановке роста культуры.

1.1.3. Физиологические роли ТА-систем

После того, как произошло открытие ТА-систем I и II типов в составе бактериальных хромосом, их стали рассматривать как полезные элементы адаптации и повышения приспособленности бактериальных популяций к стрессовым условиям, в частности за счёт участия ТА-локусов в процессах запуска программируемой клеточной смерти, стрессового ответа или персистенции в условиях действия антибиотиков [14, 152–155]. Такие данные были получены главным образом в ходе исследований, проведенных на лабораторном штамме кишечной палочки *E. coli* K-12, который содержит 19 ТА-систем I типа и 12 систем II типа. Среди них наибольший интерес представляют десять токсинов II типа, обладающих рибонуклеазной активностью и два порообразующих токсина I типа. В рамках одного из гипотетических механизмов действия компонентов ТА-систем предполагается, что токсин-антитоксिनные системы «активируются» в стрессовых условиях: то есть молекулы токсинов высвобождаются из комплексов токсин-антитоксин вследствие деградации антитоксинов ввиду их более выраженной нестабильности и, таким образом, свободные токсины могут реализовывать свою активность. Эта так называемая активация стала бы

триггером для двух альтернативных вариантов развития событий: в модели программируемой клеточной смерти эффекты токсина привели бы к гибели клеток (такой сценарий предлагается для токсина MazF) [153], тогда как в моделях стрессового ответа и формирования персистирующих форм активация токсинов (включая MazF) вызвала бы обратимое ингибирование роста бактериальной культуры [45].

1.1.3.1. Индукции программируемой клеточной смерти в стрессовых условиях

Токсин II типа MazF, как было продемонстрировано, является центральным эффектором сложного каскада, запускаемого несколькими стрессами, в частности, аминокислотным голоданием, недостатком тимицина, повреждениями ДНК, окислительным стрессом и действием антибиотиков. Была высказана гипотеза, что эти условия вызывают истощение антитоксина MazE (p)ppGpp-зависимым образом. Высвобождение токсина MazF в таком случае приводит к избирательному ингибированию трансляции: экспрессия предполагаемых жизненно важных белков будет прекращена, в то время как мРНК, кодирующие белки, лишённые специфических кодонов, расщепляемых токсином MazF (ACA), будут устойчивыми и продолжат экспрессироваться в данных условиях. Такое селективное подавление биосинтеза белка в конечном итоге приведёт к гибели подавляющего большинства клеток популяции, тем самым высвобождая питательные вещества для выживших бактерий, что является формой реализации концепции так называемой «альтруистической гибели» [152, 153, 156–158]. Некоторые исследователи полагают, что активация MazF происходит при участии EDF (внеклеточного фактора гибели – environmental death factor) – пептида, подобного сигнальным молекулам, участвующим в формировании чувства кворума у бактерий. Образование EDF

происходит в результате протеолитической деградации фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы с помощью АТФ-зависимой протеазы ClpXP [156]. Считается, что EDF активирует MazF за счёт конкурентного связывания с активным центром токсина, препятствующего взаимодействию MazF с антитоксином MazE [157]. Модель программируемой клеточной смерти была дополнительно расширена за счет введения понятия репрограммирования трансляции: было предположено, что регулон MazF состоит из генов, содержащих АСА-сайт расщепления MazF в своих 5'-нетранслируемых областях. В таком случае при активации MazF расщепление будет происходить преимущественно в этих сайтах, что приведёт к генерации безлидерных транскриптов. Одновременно MazF расщепляет сайт АСА на 3'-конце 16S рРНК, элиминируя последовательность анти-Шайна-Дальгарно и тем самым создавая специализированные рибосомы, которые будут предпочтительно транслировать безлидерные мРНК, составляющие регулон MazF [159].

Альтернативное исследование поставило под сомнение гипотезу о программируемой клеточной смерти, показав, что токсичность MazF может вызывать бактериостатический и полностью обратимый эффект при последующей индукции гиперэкспрессии антитоксина MazE [160]. Последующие исследования продемонстрировали, что некоторые из штаммов, использованных в оригинальной работе [158], на самом деле были мутированы по гену *relA*, кодирующему основной фермент, участвующий в синтезе (p)ppGpp [161, 162], хотя авторы исследования утверждали, что фенотип программируемой клеточной смерти зависел от синтеза (p)ppGpp. Кроме того, в этих исследованиях не удалось воспроизвести фенотип программируемой клеточной смерти ни с исходными штаммами, ни со штаммом *relA+* [161, 162]. Что касается репрограммирования трансляции, опосредованного MazF, то данные РНК-секвенирования показали, что MazF расщепляет большинство

транскриптов в пределах их кодирующей области, не отдавая предпочтения 5'-нетранслируемым областям. Получившиеся в результате безлидерные мРНК также подвергались расщеплению в рамках своих кодирующих последовательностей и не подвергались преимущественной трансляции [137, 138, 163]. Более того, было показано, что MazF не способен расщеплять рРНК в составе рибосом и вместо этого расщепляет пре-рРНК, предотвращая созревание рибосом и трансляционную активность в целом [137, 138]. Таким образом, вопрос участия MazF в запуске программируемой клеточной смерти по-прежнему остаётся дискуссионным.

1.1.3.2. Формирование состояний покоя и персистенции

Как уже упоминалось, хотя модель программируемой клеточной гибели предполагает, что активация системы *mazEF* необратима, независимые исследования показали, что эктопическая индукция MazF и RelE, другого токсина II типа, вызывает бактериостатический эффект и может быть устранена путем последующей совместной экспрессии соответствующих антитоксинов [160]. Было показано, что гиперэкспрессия этих токсинов ингибирует трансляцию за счет расщепления мРНК [5, 45]. Кроме того, было установлено, что уровни транскрипции систем *mazEF* и *relBE* увеличиваются при аминокислотном голодании (p)ppGpp-независимым образом и интерпретируются как активация этих систем. Эти данные привели к созданию модели, в которой кодируемые в геноме ТА-системы будут представлять собой иной тип реакции на стрессовые условия, вызывающий общее снижение уровня трансляции в условиях голодания и не будут зависеть от участия (p)ppGpp [5, 45, 164]. Позднее было установлено, что система II типа *mqsRA*, в которой ген токсина предшествует гену антитоксина, участвует в регуляции множества физиологических процессов, включая подвижность клеток,

образование биопленок [165], формирование устойчивости к солям желчных кислот [166] и окислительному стрессу [155]. В дополнение к собственной регуляторной активности в качестве антитоксина MqsA способен выступать в качестве глобального регулятора транскрипции, подавляя экспрессию генов *proS* и *csgD*, которые кодируют плеiotропные регуляторы стрессовых реакций и образования биопленок [155, 167].

За последнее десятилетие появляется всё больше данных о связи ТА-систем с образованием клеток-персистеров, устойчивых к действию антибиотиков. Сочетание множественных делеций ТА-локусов в штамме *E. coli* $\Delta 10$ (в котором было удалено десять ТА-модулей, включая *mazEF* и *relBE*) привело к постепенному снижению уровня образования персистирующих клеток в условиях действия ампициллина и ципрофлоксацина, что указывает на то, что эти десять систем токсин-антитоксин могут действовать синергетически [154]. Дальнейшие эксперименты с отдельными клетками, основанные на использовании флуоресцентных репортеров, выявили сигнальный каскад, приводящий к активации ТА-систем: стохастическое накопление (p)ppGpp в клетках-персистерах приводит к активации Lon-протеиназы за счет синтеза полифосфата, что вызывает протеолиз молекул антитоксинов, обуславливает высвобождение токсинов и глобальную остановку процессов трансляции. Этот (p) ppGpp-зависимый, ТА-индуцированный «покой» позволяет некоторым клеткам временно избегать действия антибиотиков и возобновлять рост после удаления антибиотика из среды [154]. Аналогичная модель была предложена для клеток *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар *Typhimurium*, выращенных в макрофагах *in vitro*: ТА-системы в данных условиях будут активироваться в клетках сальмонеллы, находящихся внутри вакуоли макрофагов в процессе фагоцитоза, вызывая переход в состояние покоя,

которое может способствовать приобретению толерантности к действию антибиотиков и дальнейшей реактивации и восстановлению роста после удаления антибиотика [14]. В этом случае также было показано участие множества ТА-систем, но не избыточным образом, поскольку единичные делеции ТА-локусов показали для большинства из них значительное снижение образования персистирующих форм.

Влияние токсин-антитоксиновых систем I типа на формирование устойчивости к антибиотикам менее изучено, при этом существуют два примера такого участия – это порообразующие токсины HokB и TisB [168–170]. Их гиперэкспрессия приводит к деполяризации мембран за счет порообразования, тем самым вызывая истощение уровня АТФ и запуская переход клеток в состояние покоя. В случае TisB присутствие ципрофлоксацина в среде культивирования индуцирует SOS-ответ и, как следствие, экспрессию *tisB* [168]. Для HokB активация экспрессии токсина является результатом сигнального каскада, инициируемого (p)ppGpp, как и в случае токсинов II типа, но с участием белка ObgE – универсальной ГТФазы, которая считается регулятором перехода между фазами клеточного цикла [169].

Однако ряд исследований поставил под сомнение описанные выше гипотезы: в частности, было показано, что Lon-зависимая деградация антитоксина YefM и активация транскрипции ТА-системы II типа *yefM-yoeB* (удалённой в штамме $\Delta 10$) при аминокислотном голодании не зависят от (p)ppGpp и полифосфата [171]. Позднее две статьи, посвящённые участию токсин-антитоксиновых систем II типа в формировании персистеров *E. coli*, были отозваны авторами, так как было обнаружено, что основные штаммы, использованные в тех работах, были контаминированы фагами Ф80 и λ [172–175]. Кроме того, были выявлены серьезные экспериментальные недостатки,

касающиеся использования флуоресцентных репортеров, контролирующих синтез (p)ppGpp и активацию ТА-систем, что ставит под сомнение весь регуляторный каскад, потенциально ведущий к активации систем токсин-антитоксин у персистеров на уровне единичных клеток [175]. Было также показано, что участие ТА-систем не является облигатным для формирования устойчивости к антибиотикам в культурах *Salmonella enterica* и *Pseudomonas putida*, выращенных *in vitro* [176, 177], что еще больше оспаривает связь между токсин-антитоксиновыми системами и переходом в состояние персистенции в условиях воздействия антибиотиков.

В более общем плане концепция активации ТА-систем в стрессовых условиях недавно была пересмотрена для десяти токсинов *E. coli*, обладающих рибонуклеазной активностью [178]. Действительно, различные абиотические стрессы (например, присутствие антибиотиков или тепловой шок) индуцируют транскрипцию токсин-антитоксиновых оперонов. Однако такая активация транскрипции не обязательно приводит к токсин-специфическому расщеплению РНК, что указывает на то, что токсины не высвобождаются из комплексов токсин-антитоксин в данных стрессовых условиях. Повышение уровня транскрипции этих токсин-антитоксиновых оперонов, вероятно, является вторичным эффектом, возникающим в результате ослабления ауторегуляции из-за деградации антитоксина [171, 178, 179]. Действительно, мутантный штамм *E. coli* со сниженной ДНК-связывающей активностью антитоксина YefM, а также мутанты, лишённые Lon-протеазы, больше не демонстрировали активацию транскрипции ТА-локусов в условиях стресса [178]. В случае ТА-систем I типа, хотя высокие уровни экспрессии токсинов ObgE и HokB коррелируют с повышенным образованием персистеров на уровне отдельных клеток, делеция *hokB* не влияла на выживаемость культур в присутствии офлоксацина [169]. Также эксперименты, устанавливающие

участие TisB в образовании персистеров в условиях действия фторхинолонов не удалось воспроизвести независимыми исследователями, что может свидетельствовать о зависимости результатов от используемых экспериментальных условий [168, 180, 181]. В заключение следует отметить, что роль отдельных хромосомно-кодируемых ТА-систем в реакциях на стрессовые условия и формировании состояния персистенции в бактериальных культурах не представляется первостепенной. Однако имеются сообщения о точечных мутациях в генах, кодирующих ТА-системы, приводящих к повышению уровня образования персистеров [182–184], и наиболее изученным примером является аллель *hipA7*, нарушение экспрессии которой индуцирует задержку роста и формирование толерантности на уровне субпопуляций клеток [185]. Таким образом, хотя ТА-системы, по-видимому, не являются ключевым регулятором персистенции сами по себе, они могут представлять собой гибкую основу для позитивного отбора клонов с высоким персистентным потенциалом.

1.1.3.3. Защита от «плазмидной зависимости»

В отношении хромосомно-кодируемых ТА-систем также была высказана гипотеза о возможности их функционирования в качестве резервуара нейтрализующей активности против ТА-локусов, кодируемых в плазмидной ДНК, тем самым предотвращая плазмидную зависимость [186]. Исследования показали, что антитоксин CcdA из хромосомно-кодируемой системы *ccd* в клетках *Dickeya dadantii* способен нейтрализовать токсин CcdB из той же системы, но кодируемой в пределах F-плазмиды, тем самым защищая клетки от постсегрегационной гибели. Более того, хромосомные ТА-системы могут легко развивать потенциал защиты от плазмидной зависимости в лабораторных условиях, о чем свидетельствует отбор мутантов по генам

антитоксинов *mazE* и *chpBI*, которые способны нейтрализовать токсин Kid, кодируемый плазмидой R1 [187, 188]. Хотя феномен борьбы с плазмидной зависимостью следует изучать в более широком масштабе, эти результаты позволяют предположить, что приобретение хромосомальных ТА-систем или эволюция антитоксинов могут обеспечить конкурентное преимущество за счет защиты от постсегрегационной гибели, вызванной утратой клетками плазмидной ДНК [186].

1.1.3.4. Защита от бактериофагов

Токсин-антитоксиновые системы также могут функционировать как системы защиты от инфекции бактериофагами, то есть они способны вызывать гибель заражённых клеток, предотвращая распространение бактериофагов в популяции, и приводя к так называемой abortивной инфекции [52, 189–191]. Феномен такой защиты от фагов был зафиксирован для нескольких ТА-систем: *hok-sok* (I тип) [190], *rnlAB* (II тип) [192], *toxIN* (III тип) [52] и *abiE* (VII тип) [193]. Хотя молекулярные механизмы активации ТА-модулей фаговыми инфекциям остаются в значительной степени неустановленными, считается, что подавление метаболических процессов в клетках хозяина, способствующих репликации фага, предотвращает пополнение запаса молекул антитоксинов и высвобождает токсины. Например, было продемонстрировано, как токсин-антитоксиновая система III типа *toxIN* активируется при заражении *E. coli* фагом T4 [194]. Во время поздних стадий инфекции фагом T4 в клетках хозяина жёстко блокируются процессы транскрипции, что приводит к деградации нестабильной РНК антитоксина ToxI и, таким образом, к высвобождению токсина ToxN [194]. Неудивительно, что бактериофаги выработали механизмы, позволяющие избежать abortивной инфекции. Например, описаны случаи, когда бактериофаг ФТЕ приобретал способность

кодировать РНК, мимикрирующую под РНК антитоксина *toxI*, позволяющую фагу избегать активности токсина ToxN [195–197]. В другом случае было показано, что фаг Т4 кодирует Dmd, неспецифический антитоксин, который может нейтрализовать RnlA и предотвращать abortивную инфекцию, вызванную этим токсином [191, 192]. Кроме того, фаги Т4 и Т7 кодируют ингибиторы Lon-протеиназы, и, тем самым, характеризуются способностью тормозить активацию ТА-систем II типа путем ингибирования процесса деградации антитоксина [198, 199]. Эти примеры иллюстрируют, как бактериофаги и их хозяева участвуют в своеобразной «гонке вооружений», в которую ТА-локусы вовлечены наряду с системами рестрикции-модификации и CRISPR.

Таким образом, суммируя вышеперечисленное, большинство ТА-систем, играют роль в подавлении фаговых инфекций и в формировании реакции на стрессовые условия. Например, несколько ТА-систем I типа из генома *B. subtilis* расположены на профагах, и как было показано, играют важную роль в поддержании фагов в неактивном состоянии [85]. ТА-системы II типа *mazEF* и *rnlAB* играют роль в блокировании инфекции клеток фагами P1 и T4 соответственно [200, 201]. Токсин PemK из ТА-модуля II типа *pemIK* индуцирует состояние покоя, что также ингибирует процесс инфекции клеток фагами [202]. Было показано, что токсины ToxN и AbiQ, относящиеся к ТА-локусам III типа участвуют в abortивной инфекции фагов [114, 40]. Недавно описанные токсины ToxSAS и DarT также, как было продемонстрировано, участвуют в ингибировании инфекции фагами [203, 204]. Кроме того, участие ТА-систем также было установлено в ответе на стрессовые условия, образовании биопленок и формировании клеток-персистеров [205–208]. Например, в клетках *E. coli* токсин TisB индуцирует образование клеток-персистеров в ответ на введение в среду ципрофлоксацина [168]; множество

ТА-систем IV типа в клетках *E. coli* принимают участие в формировании устойчивости к окислительному стрессу и в процессах образования биопленок [209]; ТА-системы V типа, такие как *ghoT-ghoS*, участвует в образовании персистирующих клеток [53] и адаптации роста в неблагоприятных условиях [120]; роль ТА-систем типа VI в стрессовом ответе клеток на повреждение ДНК, была установлена в отношении локуса *socB-socA*, экспрессия которого также индуцируется повреждающим ДНК агентом митомицином [54]; ТА-система VII типа, *hha-tomB*, значительно индуцируется в биопленках [210] и, предположительно, этот модуль контролирует собственно образование биопленок, а также вирулентные свойства бактерий [211]; ТА-системы VIII типа, в частности *creT-creA*, делают клетки зависимыми от CRISPR, тогда как *sdsR* может быть вовлечен в стрессовый ответ клеток, опосредованный RpoS [212, 213].

1.2. Бактериальная персистенция и фенотипическая устойчивость к антибиотикам

Популяции бактерий как правило являются неоднородными по физиологическому состоянию. Помимо активно делящихся клеток, в культуре можно обнаружить покоящиеся, персистирующие и некультивируемые формы бактерий. Некоторые из этих субпопуляций обладают способностью выживать в присутствии антибактериальных препаратов, несмотря на отсутствие наследуемых механизмов устойчивости к антибиотикам, что вызывает особый интерес для медицины. В частности, для возбудителя туберкулёза *Mycobacterium tuberculosis* показана решающая роль персистеров в развитии латентной инфекции, определении необходимой продолжительности лечения и появлении популяций с множественной лекарственной устойчивостью.

По оценкам ВОЗ, в 2023 году было зарегистрировано 10,8 миллиона случаев туберкулёза во всем мире, что обозначило разворот тренда к снижению заболеваемости, который сохранялся в течение многих лет вплоть до 2020 года [214]. Возбудитель этого заболевания – *Mycobacterium tuberculosis* – был впервые идентифицирован в 1882 году Робертом Кохом. Лишь к 1950-ым годам была разработана надежная химиотерапия туберкулёза [215]. Изначально она представляла собой комбинацию стрептомицина и парааминосалициловой кислоты, но довольно быстро такая терапия привела к развитию лекарственной устойчивости, что подчеркнуло необходимость применения более сложных схем лечения. В 1951 году для этих целей стали применять изониазид, что привело к появлению комбинированной «тройной терапии», которая требовала курса лечения продолжительностью до 24 месяцев [216]. Продолжающееся появление популяций, устойчивых к данным препаратам, привело к разработке этамбутола в 1961 году [215]. Лишь 5 лет спустя введение рифампицина в сочетании с изониазидом позволило сократить время курса лечения до 9 месяцев. Наконец, внедрение пипразинамида еще больше сократило время лечения до 6 месяцев, что привело к формированию устоявшейся комбинированной терапии, которая используется и по сей день [215]. Наиболее распространенная схема включает в себя комбинацию изониазида, этамбутола, рифампицина и пипразинамида в течение периода от 6 до 9 месяцев [217]. Любопытно, что два препарата, которые позволили значительно сократить время лечения, рифампицин и пипразинамид, имеют общее свойство: способность убивать толерантные к антибиотикам бактерии [218, 219].

1.2.1. Толерантность и резистентность

Выделение и генетическая характеристика устойчивых к антибиотикам бактериальных штаммов выявили множество молекулярных механизмов формирования резистентности [220], включая мутации мишеней антибактериальных препаратов, наличие ферментов, непосредственно инактивирующих антибиотики, а также активацию транспортных систем, которые выводят антибиотик из клетки [221]. Совокупность генов, задействованных в данных механизмах, называют «резистомом» [222]. Однако еще в 1944 году было показано, что бактерии способны выдерживать широкий диапазон воздействий антибиотиков, не приобретая мутаций, обуславливающих устойчивость [223, 224]. Термины «толерантность» [225] и «персистенция» [223] были введены, чтобы отличать эти разные по своей сути способы избегания действия антибактериальных веществ, но границы применимости данных терминов и их отличие друг от друга оставались неоднозначными [226, 227]. Термин «резистентность» используется для описания наследуемой способности микроорганизмов расти при высоких концентрациях антибиотика [221] независимо от продолжительности воздействия и количественно определяется минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) конкретного антибиотика. «Толерантность» используется в более широком смысле для описания способности микроорганизмов, наследуемо или нет, выживать при кратковременном воздействии высоких концентраций антибиотика безотносительно МИК, что часто достигается за счет замедления жизненно важных процессов в бактериальной клетке. Например, толерантность к β -лактамам может возникнуть при низкой скорости роста бактерий [228], что связано с медленной сборкой клеточной стенки. Поскольку для уничтожения бактерий β -лактамам требуется

активная сборка клеточной стенки, более медленный рост приведет к увеличению минимальной продолжительности действия антибиотика для достижения той же скорости гибели популяции клеток независимо от его концентрации. Покоящееся состояние бактерий можно также рассматривать как крайний случай замедленного роста, тогда покой, который приводит к формированию толерантности, можно назвать проявлением фенотипической устойчивости к действию антибиотиков [229].

Толерантность может быть приобретена посредством генетической мутации или вызвана условиями окружающей среды [229]; например, было показано, что неблагоприятные условия роста культуры повышают толерантность к нескольким классам антибиотиков. Эта толерантность была использована исследователями для выделения ауксотрофных мутантов, поскольку только не дающие роста ауксотрофы были способны выжить в условиях, когда мутагенизированная бактериальная популяция подвергается воздействию пенициллина в отсутствие лимитирующего метаболита [230]. Состояние отсутствия роста, приводящее к толерантности, может быть вызвано и самим антибиотиком, и оно также впоследствии способно защитить бактериальные клетки от летального действия этого антибиотика [231].

Термин «персистенция» также описывает способность бактерий выживать при воздействии высоких концентраций антибиотика, но на уровне субпопуляций клеток, выявляемых при действии данного препарата [232]. Персистенция обычно наблюдается, когда большая часть бактериальной популяции быстро погибает, в то время как некая субпопуляция сохраняется в течение гораздо более длительного периода времени несмотря на то, что все клетки данной популяции исходно

являлась потомками одного клона. Результирующая кривая гибели клеток в данном случае будет двухфазной [233] из-за гетерогенной реакции персистентных и неперсистентных субпопуляций клеток. Более медленная скорость гибели персистирующей субпопуляции не передается по наследству: если персистирующие бактериальные клетки изолировать и начать выращивать заново, а затем повторно подвергнуть воздействию того же самого антибиотика, будет наблюдаться тот же гетерогенный ответ на введение препарата, что и в исходной популяции, с последующим разделением на персистирующие и неперсистирующие субпопуляции [223]. Первые прямые наблюдения за персистенцией на уровне отдельных клеток показали, что замедленный рост, а также состояние покоя небольшой субпопуляции бактериальных клеток могут лежать в основе высокой выживаемости всей популяции в целом [233]. После этих первоначальных наблюдений были описаны дополнительные, обычно дозозависимые, механизмы персистенции, которые также характеризуются двухфазной кинетикой гибели [234].

Экспериментальное отличие разнообразных стратегий, используемых бактериальными клетками для выживания во время воздействия антибиотиков, важно по нескольким причинам. Во-первых, данные стратегии, несмотря на внешнее сходство, различаются по основному механизму реализации, а это означает, что борьба с бактериями и лечение инфекционных заболеваний будет скорее неэффективным, если они применяются без оглядки на стратегии выживания бактерий. Во-вторых, лежащие в их основе механизмы и эксперименты, необходимые для исследования этих механизмов, могут сильно различаться для каждой стратегии. В-третьих, диапазон антибиотиков, на который будут направлены усилия по преодолению их действия, может различаться в

зависимости от выбранной стратегии выживания микроорганизмов. Например, толерантность, обусловленная замедленным ростом, часто дает преимущество перед несколькими классами антибиотиков, тогда как большинство механизмов устойчивости специфичны для одного класса антибактериальных соединений. Наконец, количественное измерение параметров резистентности, толерантности или персистенции требует разных подходов и экспериментальных методов для каждой стратегии выживания.

Резистентность к антибиотикам, которая обычно носит наследственный характер, связана с многочисленными молекулярными механизмами, которые были всесторонне описаны [235, 236]. Важно отметить, что механизмы бактериальной резистентности снижают эффективность антибиотика; то есть, чтобы оказать на устойчивый штамм тот же эффект, что и на чувствительный штамм, необходима более высокая концентрация антибактериального препарата [237]. Устойчивость количественно определяется величиной МИК, которую можно определить как минимальную концентрацию антибиотика, необходимую для предотвращения роста культуры. На практике МИК измеряется путем воздействия на популяцию бактерий возрастающими концентрациями антибиотика в стандартизированной питательной среде. Это позволяет определить минимальную концентрацию, при которой рост культуры не обнаруживается [238], причём диапазон проверяемых концентраций обычно ограничивается концентрациями антибиотика, используемого в клинической практике. МИК, определяемая с помощью этих тестов, рассматривается как удобный показатель устойчивости, и бактериальный штамм с более высокой МИК, чем другой штамм, будет считаться более устойчивым [221]. Измерения МИК, указывающие на

полную нечувствительность к антибиотику, можно рассматривать как крайний случай резистентности.

МИК как общий показатель для измерения реакции бактериального штамма на антибиотик имеет два основных ограничения: во-первых, величина МИК неинформативна для толерантных, а не резистентных штаммов бактерий. Во-вторых, МИК, измеренная *in vitro*, варьирует в зависимости от используемых экспериментальных условий, что может повлиять на полезность этого показателя с позиций эффективности антибиотика *in vivo* [239]. Однако простота измерения МИК означает, что в настоящее время это единственный показатель, который обычно используется на практике для принятия решений о схемах лечения инфекций, вызванных бактериальными штаммами, выделенными в клинике [240].

Под толерантностью обычно понимают способность бактериальной популяции выживать при более кратковременном воздействии антибиотиков [231], даже в концентрациях, значительно превышающих МИК. Важно отметить, что для достижения такого же уровня эрадикации клеток толерантного штамма, как и восприимчивого штамма, требуется более длительное время воздействия, а не более высокая концентрация антибиотика. Поскольку толерантные бактерии могут иметь такую же МИК, что и нетолерантные бактерии, МИК не является информативным показателем для оценки толерантности [241, 242]. Одним из предложенных подходов к оценке толерантности является оценка кривых выживаемости культур в зависимости от времени воздействия различных концентраций антибиотика [231]. Однако без стандартного метода интерпретации этих кривых результаты, полученные в разных лабораториях, трудно сравнивать [243]. Еще одной предложенной

количественной величиной толерантности является соотношение МБК/МИК [244], где МБК представляет собой минимальную бактерицидную концентрацию, а именно концентрацию антибиотика, необходимую для уничтожения $\geq 99,9$ % клеток в бактериальной культуре, обычно после 24 часов инкубации. В случаях, когда концентрации антибиотика, близкие к МИК, вызывают только остановку роста, а МБК приводит к гибели, соотношение МБК/МИК будет иметь большее значение. Таким образом, этот показатель может точно оценить уровень толерантности, индуцированной антибиотиком, но было установлено, что он плохо коррелирует с другими формами толерантности [241, 242, 245, 246]. Еще один количественный показатель определения толерантности бактерий, выводимый из кинетики гибели популяции в условиях действия антибиотиков, — минимальная продолжительность бактерицидного воздействия: эта величина, которая основывается на представлении о том, что для эффективной эрадикации толерантного бактериального штамма требуется больше времени экспозиции с антибактериальным препаратом, чем в случае восприимчивого штамма.

Данный показатель определяется как типичная продолжительность воздействия, необходимая для уничтожения определенной части (например, 90% или 99,9%) бактериальной популяции [247] антибиотиком в концентрациях, значительно превышающих МИК (то есть, когда скорость гибели клеток не зависит от концентрации антибиотика). Предположение о возможности оценки степени толерантности бактериальной культуры посредством определения минимальной продолжительности бактерицидного воздействия, базируется на том, что при высоких концентрациях антибиотика кинетика

гибели популяции достигает эффекта насыщения, и практически не зависит от концентрации и обуславливается в первую очередь продолжительностью воздействия [248].

Бактериальная толерантность к антибиотикам обычно обсуждается в литературе в тандеме с остановкой роста культур и общим снижением метаболизма [233, 249–252]. Как и в примере с β -лактамами, замедление или полное прекращение роста приводит к снижению или уменьшению чувствительности клеток ко многим антибиотикам. Это прямой результат эволюционного отбора среди микроорганизмов в условиях конкуренции за ресурсы, при котором преимущество получают антибиотики, ориентированные на быстрорастущие бактериальные клетки как наиболее конкурентоспособные в потреблении питательных веществ и источников энергии [253]. Однако различные классы антибиотиков действуют на разнообразные клеточные процессы, и иногда невозможно искусственно отделить эффективность действия антибиотика от изменений скорости роста культуры. Например, в клетках *E. coli*, рост которых подавлен из-за стрингент-ответа, обработка хлорамфениколом позволяет возобновить сборку клеточной стенки, в результате чего бактериальные клетки становятся чувствительны к β -лактамам, хотя их рост, по существу, остановлен [254].

Однако нельзя игнорировать сообщения о том, что клетки *E. coli* могут погибать в условиях действия β -лактамов и при остановке роста культуры, что часто наблюдается в экспериментах, где создаётся динамическое равновесие процессов размножения и гибели клеток. В такой культуре β -лактамы эффективны только в отношении делящихся клеток, но общий рост бактериальной популяции при этом всё равно останавливается.

1.2.2. Толерантность и персистенция

Как уже было упомянуто выше, термины «персистенция» и «толерантность» часто используются как синонимы. Некоторые предпочитают проводить границу между этими двумя явлениями, описывая их как схожие, но всё же разные феномены [255]. Явление персистенции, по-видимому, в значительной степени имеет чёткие границы применимости исходя из определения, согласно которому, персистирующие клетки в условиях действия антибиотика представляют собой часть субпопуляции, не растущей в присутствии антибактериального препарата, но генетически идентичной популяции, погибающей в условиях действия данного стрессового фактора. Тогда, согласно этому определению, бактерии можно назвать толерантными или персистирующими в большей степени по отношению к окружающим клеткам, а также исходя из особенностей методики определения таких субпопуляций и контекста проводимых исследований. Так, например, термин «персистенция» чаще используется в рамках описания бактериальных инфекций, плохо поддающихся эффективной антибиотикотерапии и характеризующихся сохранением возбудителя в организме хозяина. Поскольку нет доказательств, подтверждающих механистическое различие персистирующих и толерантных бактерий, многие исследователи используют эти термины как синонимы. Механизмы формирования толерантности в культурах *M. tuberculosis* поразительно схожи с механизмами персистенции: среди них общее замедление метаболизма, стрессовые реакции на уровне транскрипции и трансляции, задействование токсин-антитоксиновых систем, перестройки на уровне клеточных мембран [256, 257].

Таким образом, персистирующие бактерии представляют собой толерантную к лекарственным препаратам субпопуляцию, которая

выдерживает воздействие антибиотиков посредством ненаследственных механизмов. Далее целесообразно рассмотреть, за счёт каких механизмов достигается формирование таких субпопуляций.

1.2.3. Происхождение и сущность персистенции

Точное происхождение персистирующих бактерий остается предметом дискуссий. Ранее было описано, что клетки-персистеры принадлежат к двум разным типам, а именно их возникновение может носить либо индуцибельный, либо стохастический характер, что связано с ответами на ряд вопросов о принципах формирования таких клеток: существуют ли персистирующие клетки в популяции до того, как на неё окажет влияние стрессовый фактор; или появление персистеров связано с реакцией активно растущих бактерий на стрессовые условия окружающей среды? Соответственно, часть клеток-персистеров формируются в ответ на индукцию внешними триггерами, тогда как другая часть образуется в популяции стохастически и не зависит от экзогенных воздействий [1, 233]. Такое различие бывает трудно провести, учитывая, что персистеры могут составлять 1% или менее от всей бактериальной популяции и могут быть окончательно идентифицированы только по оценке выживаемости в ответ на стрессовое воздействие [258].

В некоторых исследованиях, проводившихся на популяциях *E. coli*, сообщается о стохастически возникающей персистенции в связи со снижением доступности питательных веществ, влияющих на синтез АТФ в клетке [259, 260]. Предполагается, что наблюдаемое у формируемых персистеров увеличение устойчивости к цiproфлоксацину и ампициллину связано с уменьшением выработки АТФ, что приводит к снижению активности мишеней вышеупомянутых антибиотиков с последующим приобретением

толерантности к данным антибактериальным препаратам [259]. Дальнейший анализ на уровне отдельных клеток выявил, что 15 из 16 клеток-персистеров не осуществляли деление и до введения в среду ампициллина, что подтверждает их происхождение в качестве стохастических персистирующих форм [260]. Другие группы смогли идентифицировать персистеры *E. coli*, происходящие из метаболически активных клеток [168, 181]. В экспериментах на уровне единичных клеток применение методов микрофлюидики позволило наблюдать за процессами в клетках-персистерях после их идентификации в условиях действия офлоксацина [181]. Авторы смогли отследить изменения в скорости удвоения ДНК в клетках непосредственно перед и после добавки офлоксацина: и, хотя у персистирующих клеток было выявлено небольшое, но значимое снижение темпов репликации по сравнению с общей популяцией, авторы объяснили это высокой статистической мощностью своего анализа, поскольку они не смогли обнаружить достоверное различие при уменьшении рандомизированных выборок среди не персистирующих форм [181]. Другая группа обнаружила, что ципрофлоксацин, также являющийся фторхинолоном, способен индуцировать образование персистентных клеток *E. coli* посредством SOS-ответа, запускаемого из-за повреждения ДНК [168]. У *Pseudomonas aeruginosa* наблюдалось усиление образования персистеров в ответ на введение в среду культивирования сигнальных молекул ощущения кворума [261]. Вышеописанные факты указывают на то, что механизмы образования клеток-персистеров могут различаться у разных видов бактерий и могут варьироваться в зависимости от конкретного стрессового фактора, применяемого к бактериям одного и того же вида. Когда, например, в первом эксперименте, подтверждающем стохастическую персистенцию, для выявления популяции персистеров *E. coli* был выбран ампициллин, бактерии,

которые могли быть толерантными к другому антибиотику, погибли, что не позволило их выделить и охарактеризовать [260].

Микобактерии также демонстрируют признаки, присущие как стохастической, так и индуцируемой персистенции. Рост культур микобактерий характеризуется гетерогенностью: делящиеся клетки асимметрично удлиняются на одном из двух полюсов таким образом, что только одна из дочерних клеток наследует удлиняющийся полюс материнской клетки [262]. Такие дочерние клетки быстрее завершают деление и, кроме того, как было обнаружено у *Mycobacterium smegmatis*, они более чувствительны к антибиотикам, нарушающим сборку клеточной стенки, таким как изониазид. В то же время, было установлено, что дочерние клетки, не наследующие удлиняющийся полюс, обладают большей чувствительностью к рифампицину [262]. Этот результат согласуется с наблюдением, согласно которому большинство антимикобактериальных препаратов обладают плохой активностью в отношении медленно растущих клеток, за исключением рифампицина и пиразинамида [263, 264]. Следует отметить, что удаление гена *lamA*, участвующего в ингибировании образования новых полюсов роста, приводит к более симметричному делению клеток в культурах *M. tuberculosis* [265]. Такие более однородные в плане морфологии клетки демонстрировали более высокую чувствительность к рифампицину, а в случае аналогичных культур *M. smegmatis* – также к препаратам, воздействующим на клеточную стенку [265]. Принимая во внимание медленный, асимметричный характер роста *M. tuberculosis*, нетрудно прийти к выводу, что подобная гетерогенность может привести к стохастическому формированию персистирующих клеток. И действительно, применение микобактериофага с двойным репортером позволило исследователям продемонстрировать активацию экспрессии

связанных с персистенцией генов *M. tuberculosis* непосредственно до применения изониазида [266].

С другой стороны, *M. tuberculosis* является примером успешного патогена в контексте адаптации к стрессовым условиям в клетках организма-хозяина. Было показано, что системы передачи сигнала необходимы клеткам *M. tuberculosis* для формирования латентной инфекции в лёгочной ткани и играют роль в приспособлении к стрессовым факторы окружающей среды [267, 268]. Также, было установлено, что для культур *M. tuberculosis*, подвергнутых стрессовому воздействию, характерны ошибки трансляции, что приводило к увеличению выживаемости бактерий при действии рифампицина [269]. Секвенирование участков генома, определяющих устойчивость к рифампицину (регион RRDR), не выявило мутаций среди выживших бактерий, что позволило предположить о индуцируемом характере персистенции [269]. В совокупности эти наблюдения показывают, что в культурах *M. tuberculosis* присутствует смесь ранее существовавших и индуцируемых персистирующих бактерий. Эта гетерогенность, вероятно, еще больше усугубляется в клетках хозяина, где бактерии *M. tuberculosis* сталкиваются с большим разнообразием стрессовых воздействий [270–272].

Таким образом, если известно, что персистирующие бактерии имеют важное значение для определения тяжести протекания инфекции, установления схем лечения и выявления популяций, устойчивых к лекарственным препаратам (как, например, в случае *M. tuberculosis*), то независимо от происхождения, важно учитывать физиологию персистеров при попытках разработать методы их эрадикации.

Возможно, наиболее общепринятой характеристикой персистеров является состояние покоя [273]. Считается, что для персистирующих клеток характерно снижение общего уровня метаболизма, что защищает их от

действия антибиотиков ввиду того, что системы, на которые действуют антибиотики, неактивны. Было высказано предположение, что витамин С и цистеин могут предотвращать подобное «отключение» метаболизма за счет стимулирования дыхательной активности клеток, что приводило к эрадикации клеток *M. tuberculosis in vitro* [274, 275]. В условиях голодания или в стационарной фазе в культурах *E. coli* и *P. aeruginosa*, когда бактерии демонстрируют в среднем более низкий уровень метаболизма, популяции, по-видимому, обогащаются персистирующими клетками [180, 245]. Подобный эффект наблюдается и в культурах *M. tuberculosis* в условиях голодания, когда активация стринжент-ответа приводит к повышенному образованию персистеров, а удаление гена *relA*, кодирующего пиррофосфокиназу (фермента, модулирующего инициацию стринжент-ответа), напротив, снижает скорость формирования персистирующих клеток [276, 277]. Также было высказано предположение, что обогащение стационарных культур персистерами является результатом истощения запасов АТФ [260].

Тем не менее, некоторые исследовательские группы представили доказательства того, что клетки-персистеры в культурах *E. coli* и *M. smegmatis* могут быть метаболически активными и даже активно делиться [234, 278]. В случае *E. coli* 20 из 100 персистеров были идентифицированы как метаболически активные методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией [278]. Тем не менее, данный результат является объектом критики ввиду допущения на этапе планирования экспериментов возможности привнесения персистентных бактерий вместе с инокулятом [273]. Также, было показано, что клетки *M. smegmatis* могут осуществлять активный рост и деление в присутствии изониазида до тех пор, пока подавляется экспрессия каталазы (KatG), которая осуществляет перевод изониазида в его активную лекарственную форму [234]. Однако критики данного подхода относят такие

клетки не к персистирующим, а к активно растущим клеткам, но не экспрессирующим KatG [273]. А сам этот случай можно считать уникальным, поскольку клетки не подвергаются какому-либо антибиотическому стрессу до тех пор, пока не произойдет активация препарата за счёт собственного фермента бактерий, что неприменимо к явлению персистенции в целом [273].

Как кратко упоминалось выше, было показано, что культуры *M. tuberculosis*, подвергнутые стрессовому воздействию, демонстрировали больше ошибок трансляции, что приводило к увеличению выживаемости бактерий в условиях действия рифампицина [269]. Авторам также удалось сконструировать рекомбинантный штамм *M. smegmatis* с еще более высоким уровнем ошибок трансляции, и такие бактерии демонстрировали в 1000 раз больше колоний на плотной среде, содержащей рифампицин, несмотря на отсутствие мутаций в генах, определяющих устойчивость к нему (регион RRDR) [269]. Затем авторы создали штамм *M. smegmatis* с более высокой точностью работы рибосом, что приводило к меньшему количеству ошибок трансляции. Данный штамм продемонстрировал снижение выживаемости бактерий в условиях действия рифампицина по сравнению с диким типом, что позволяет предположить, что ошибки трансляции представляют собой уникальный механизм, благодаря которому микобактерии могут переносить стрессовое воздействие, вызываемое антибиотиками, хотя неизвестно, существовали ли мутации, придающие устойчивость к рифампицину, за пределами региона RRDR в случае штамма с более высоким уровнем ошибок трансляции белков [269].

Другое исследование, проведенное с образцами *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, продемонстрировало «полунаследуемый» характер роста культур в присутствии рифампицина [279]. В частности, в клетки *M. smegmatis* были введены флуоресцентные метки, а затем образцы были подвергнуты

воздействию возрастающих концентраций рифампицина. Флуоресцентный сигнал клеток, способных к делению, со временем стал ослабевать ввиду снижения количества меток в дочерних клетках. В конечном итоге, была выделена уникальная популяция клеток, способная расти в присутствии рифампицина в концентрации 36 мкг/мл [279]. При этом, как было ранее установлено, пиковая концентрация рифампицина в сыворотке у людей составляет от 3 до 5 мкг/мл [280, 281]. Дальнейший высев образцов этих толерантных к рифампицину культур на плотную питательную среду с этим же антибиотиком привёл к образованию большого числа колоний [279]. Секвенирование образцов, взятых с полученных колоний, показало, что все анализируемые клоны *M. smegmatis* относятся к дикому типу по гену *rpoB*, который кодирует РНК-полимеразу, являющуюся мишенью рифампицина. Повторный пассаж данных клонов на плотную питательную среду привёл к увеличению выживаемости культур ещё в 10 раз по сравнению с первым воздействием препарата. Когда тот же эксперимент был проведён в отношении чувствительных к рифампицину клинических изолятов активной туберкулёзной инфекции, повышение выживаемости среди анализируемых образцов наблюдалось по мере увеличения продолжительности терапии рифампицином [279]. Однако второй пассаж данных изолятов на неселективной среде в течение 16 часов, не показал никакого преимущества в выживаемости по сравнению с образцами, никогда не подвергавшимися воздействию рифампицина, что делало наблюдаемый эффект «полунаследуемым» [279]. В другом исследовании оценивалось влияние асимметричного роста микобактерий на толерантность к рифампицину, и было обнаружено, что она коррелирует с большим размером клеток и наследованием удлиняющегося полюса клетки во время деления [282]. Ещё одно исследование персистирующих форм *M. tuberculosis* показало, что персистеры,

образующиеся в условиях действия рифампицина или пипразинамида продолжают осуществлять активную транскрипцию несмотря на очевидную остановку роста, связанную с персистенцией [283].

Таким образом, рассмотренные в данном разделе примеры роста культур микобактерий в присутствии антимикобактериальных препаратов позволяют сделать вывод о том, что, хотя большинство персистеров проявляют признаки покоящихся клеток, некоторые из них всё же относятся скорее к активным клеткам, либо их субпопуляция находится в состоянии динамического равновесия между активным и покоящимся состояниями.

1.2.4. Фенотипическая устойчивость

Помимо толерантности и персистенции, для описания активных (непокоящихся) бактериальных клеток, способных выживать в присутствии антибиотиков целесообразно обсудить феномен фенотипической устойчивости и роль этого явления наряду с двумя вышеупомянутыми в осложнении лечения инфекций, таких как, например, туберкулёз.

Как уже обсуждалось выше в разделе о толерантности и персистенции, грань между этими понятиями очень тонка, и на практике они часто демонстрируют взаимозаменяемость. Напротив, устойчивость (резистентность) к антибактериальным препаратам четко дифференцируется на основе двух признаков: наследственной передачи этого свойства и возможности активного роста бактерий в присутствии антибиотиков.

Термин «фенотипическая устойчивость» также описывает явление, при котором бактериальные клетки могут размножаться в присутствии антибиотиков, но механизм, обеспечивающий рост такой популяции, не передается по наследству. В вышеописанных примерах каждый из авторов использует разные термины для характеристики наблюдаемых явлений: это и

динамическая персистенция [234], и фенотипическая устойчивость [269, 279], и толерантность [279]. Все эти исследования сосредоточены на субпопуляциях бактерий, задействующих ненаследуемые гетерогенные механизмы выживания клеток в ответ на применяемое антибиотическое стрессовое воздействие.

Как обсуждалось выше, *M. tuberculosis* способен адаптироваться к неблагоприятным изменениям окружающей среды различными способами, включая переход в состояния метаболического покоя, что делает большинство антимикобактериальных препаратов неэффективными до тех пор, пока не произойдет реактивация бактерий [284]. Кроме того, пока отдельные субпопуляции бактерий существуют в состоянии «динамической персистенции» [234] или «фенотипической устойчивости» [269, 279], существует вероятность того, что некоторые из этих активных персистирующих бактерий могут приобретать спонтанные мутации, приводящие к приобретению ими детерминант резистентности. Хотя существует мало доказательств того, что устойчивые бактерии возникают непосредственно из персистирующих популяций [285, 286], любые бактерии, пережившие антибиотический стресс, могут реактивировать и продолжать рост [256, 273, 283]. Данный процесс в случае несоблюдения схем лечения может приводить к росту популяций бактерий с лекарственной устойчивостью [287]. Также, вызывает беспокойство и доказательства того, что микобактерии могут развивать фенотипическую устойчивость к антибиотикам из-за ошибок транскрипции или трансляции, вызванных различными стрессовыми факторами [234, 279, 283].

Таким образом, изучение механизмов формирования фенотипически устойчивых бактерий видится более важным, чем дискуссии о терминологии и о том, как правильно называть изучаемые популяции бактерий –

толерантными, фенотипически устойчивыми или персистентными. В рамках данного диссертационного исследования эти термины будут употребляться как контекстуальные синонимы. Такой способ рассмотрения исследуемого феномена даёт возможность сосредоточиться на задаче выявления механизмов формирования фенотипической устойчивости и поиске ответа на вопрос: каким образом может быть повышена чувствительность патогенных микроорганизмов к антибиотикам и преодолена их фенотипическая невосприимчивость к антибактериальным препаратам?

1.3. ТА-локусы как мишени в новых стратегиях борьбы с бактериями

Появление нечувствительных к антибиотикам бактерий является критически значимой проблемой современной медицины [288]. Значительные усилия прилагаются к поиску новых противомикробных веществ для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми развивающимися полирезистентными патогенами. Бактериальные ТА-модули могут представлять собой перспективные мишени для таких соединений. Поскольку ТА-локусы представляют собой двукомпонентные системы с оперонной организацией, регуляция экспрессии в ТА-локусах осуществляется по принципу ингибирования конечным продуктом, то есть напрямую зависит от изменений концентрации как антитоксинов, так и ТА-комплексов [289, 290]. Деградация антитоксина клеточными протеазами высвобождает токсин, приводя к развитию бактериостатического или бактерицидного эффекта [291–294]. Поскольку токсины нарушают основные метаболические процессы бактерий, их можно рассматривать как внутриклеточные «молекулярные бомбы замедленного действия», которые активируются при определенных условиях окружающей среды [295]. Таким образом, молекулы, способные

искусственно активировать токсины, могут образовать новый класс антибактериальных препаратов, которые могут представлять собой альтернативу антибиотикам [296]. ТА-системы II типа широко распространены у бактерий [297], и их механизмы достаточно изучены [297], чтобы они служили многообещающими кандидатами для проверки достоинств этой концепции.

Потенциальное использование ТА-систем в борьбе с бактериальными инфекциями рассматривалось в нескольких обзорах [298–301]. В данном разделе описываются наиболее многообещающие антибактериальные стратегии с использованием ТА-систем II типа.

Более того, наличие ТА-систем II типа было подтверждено у основных клинически значимых бактериальных патогенов, и важно отметить, что ТА-системы не имеют гомологов в геноме человека. На сегодняшний день на основе воздействия на ТА-локусы предложено несколько антибактериальных стратегий [298, 299], но в большинстве случаев они не подкреплены значимыми экспериментальными данными.

В данном разделе рассматриваются наиболее многообещающие подходы, такие как: прямая активация ТА-систем путем использования специфических молекул, которые препятствуют образованию ТА-комплексов и нарушают тонкую стехиометрию молекул токсинов и антитоксинов в бактериальных клетках; и непрямая активация ТА-систем через воздействие на другие клеточные компоненты, функции которых взаимосвязаны с работой ТА-модулей. Другой инновационный метод, который здесь рассматривается, предполагает инженерию видоспецифичных токсинов, которые могут вызывать избирательную гибель штаммов патогенных бактерий.

1.3.1. Способы прямой активации ТА-систем

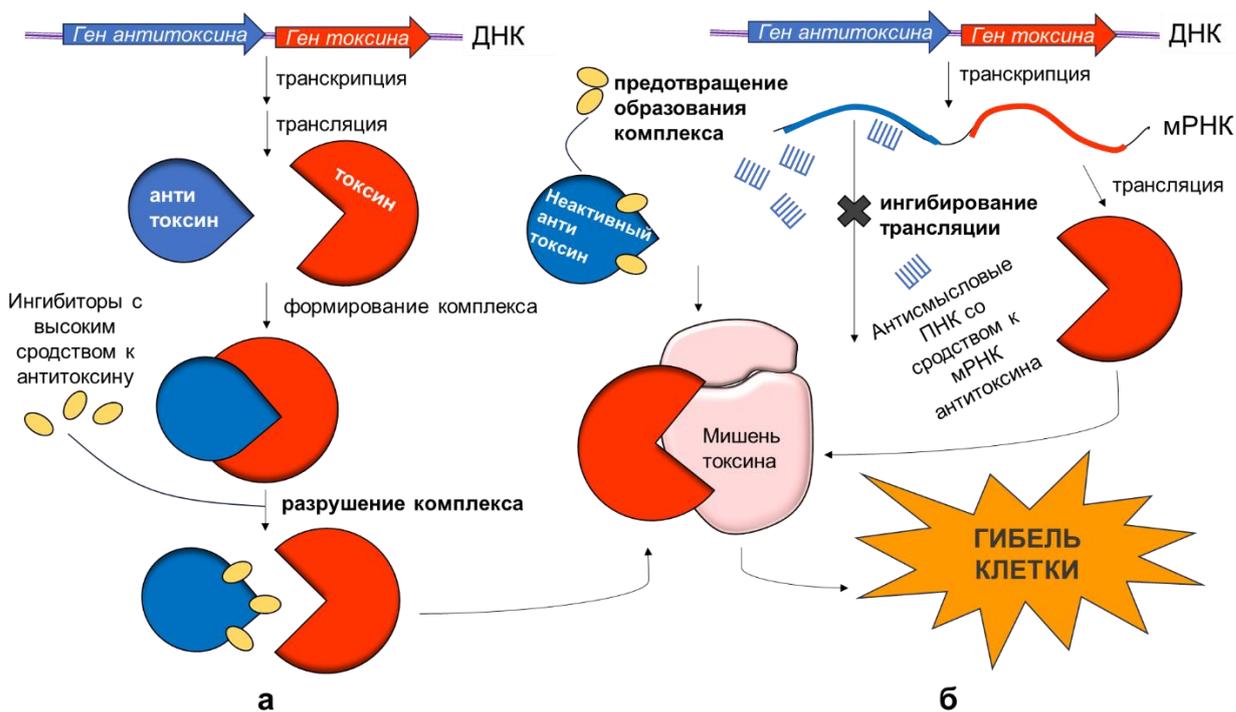
1.3.1.1. Нарушение или предотвращение образования ТА-комплексов

Самая очевидная стратегия прямой активации антибактериального эффекта ТА-систем II типа основана на разрушении токсин-антитоксиновых комплексов, что приводит к высвобождению токсина (рисунок 2а). Эта стратегия была экспериментально опробована несколькими исследовательскими группами, которые сосредоточили свои усилия на выявлении пептидных ингибиторов с высоким средством, которые могут эффективно вытеснять токсины из образующихся ТА-комплексов.

В частности, в качестве исследовательской модели была взята ТА-система ϵ - ζ из *Streptococcus pyogenes*, поскольку было показано, что свободный ζ -токсин вызывает остановку размножения клеток за счёт ингибирования биосинтеза клеточной стенки, подобно тому, как это происходит при применении известных противомикробных препаратов [302]. Анализ олигопептидных библиотек на способность нарушать сборку ϵ - ζ -комплексов привёл к идентификации библиотеки, содержащей смесь олигопептидов длиной 17 аминокислот, которые препятствовали взаимодействию молекул токсинов и антитоксинов. Однако дальнейшее субфракционирование этой библиотеки привело к снижению эффекта, из-за чего авторы предположили, что наблюдавшееся первоначально разрушение ϵ - ζ -комплексов могло быть следствием согласованного действия нескольких олигопептидов со слабой связывающей активностью. Тем не менее, это исследование предоставило подтверждение концепции антимикробного потенциала данной стратегии [302].

Аналогичный подход был применен в случае двух родственных ТА-систем — *pemIK* и *toxXT* у *Bacillus anthracis*. Первый модуль кодирует токсин

RemK – рибонуклеазу, гиперэкспрессия которой оказывает токсическое действие на клетки возбудителя сибирской язвы, характеризующееся резким ингибированием процессов трансляции [303]. По результатам структурного моделирования белков *in silico* было разработано несколько пептидов, имитирующих С-концевой домен антитоксина RemI, который участвует в связывании токсина. Эксперименты *in vitro* показали эффективность разработанных молекул и продемонстрировали возможность нарушения взаимодействия токсинов и анитоксинов с помощью октапептидов [304]. Аналогичные результаты были получены в исследованиях родственной ТА-системы *toxXT*. На основе кристаллической структуры комплекса MoxX-MoxT была разработана серия пептидов [305], которые эффективно нарушали взаимодействие токсина MoxT с анитоксином MoxX, а также стимулировали рибонуклеазную активность MoxT [306] (рисунок 2а).



(а) разрушение комплекса токсина и анитоксина и/или предотвращение образования ТА-комплекса; (б) ингибирование трансляции анитоксина
 Рисунок 2 – Предлагаемые антибактериальные стратегии, основанные на прямой активации токсинов в ТА-системах

Аналогично, после детального анализа множества ТА-локусов *varBC* микобактерий туберкулёза были разработаны пептиды на основе *VarB* и *VarC*, которые эффективно разрушают ТА-комплексы, вызывая активацию рибонуклеазы *VarC* [307].

1.3.1.2. Ингибирование биосинтеза молекул антитоксинов и воздействие на мишени токсинов

Высвобождение молекул токсина также может быть вызвано уменьшением количества молекул антитоксина в бактериальной клетке. Одним из способов достижения такого эффекта является блокирование трансляции антитоксина (рисунок 2б) [299]. Гены, кодирующие токсин и антитоксин и совместно транскрибируемые в виде единой мРНК, обладают отдельными последовательностями Шайна-Дальгарно [308]. Следовательно, ингибирование трансляции антитоксина не должно влиять на трансляцию токсина. Данный подход был протестирован в рамках разработки методики ингибирования трансляции антитоксинов ТА-систем *mazEF* и *hipBA* *E. coli* на основе пептидно-нуклеиновых кислот (ПНК) [309] – синтетических линейных полимеров N-(2-аминоэтил)глицина или других полиамидов-псевдопептидов, способных нековалентно связываться с нуклеиновыми кислотами. Специфические антисмысловые ПНК связывались с участками мРНК, несущими последовательности антитоксинов *mazE* или *hipB*, в результате снижая внутриклеточные уровни этих транскриптов, что вызывало эффективное ингибирование роста *E. coli* [309]. Решающая роль токсинов *MazF* и *HipA* в наблюдаемом ингибировании роста была подтверждена тем, что делеционные мутанты *E. coli*, лишённые генов, кодирующих токсины, были устойчивыми к действию антитоксин-специфичных ПНК.

Другая стратегия, основанная на применении ПНК и описанная в той же работе, предусматривает использование олигомерных ПНК, направленных на клеточные мишени токсинов, минуя, таким образом, взаимодействие с компонентами ТА-систем. Было продемонстрировано, что ПНК могут имитировать действие токсина HcrA, подавляя экспрессию гена *gltX*, кодирующего клеточную мишень токсина – глутамил-тРНК-синтетазу [309]. Для этих экспериментов олигомеры ПНК были конъюгированы с проникающим в клетку пептидом (KFF)₃K, что также указывает на важность использования эффективного носителя для введения антисмысловых олигонуклеотидов в бактериальные клетки [309].

Описанные выше результаты экспериментально подтвердили, что функционирование ТА-системы чувствительно к применению специфичных антисмысловых олигонуклеотидов, что послужило основой для их дальнейшего использования в разработке новых антимикробных стратегий. Важно отметить, что олигомеры ПНК проявляют устойчивость к нуклеазам и протеазам, имеют высокую аффинность связывания с природными нуклеиновыми кислотами и незначительную токсичность для эукариотических клеток [320, 311].

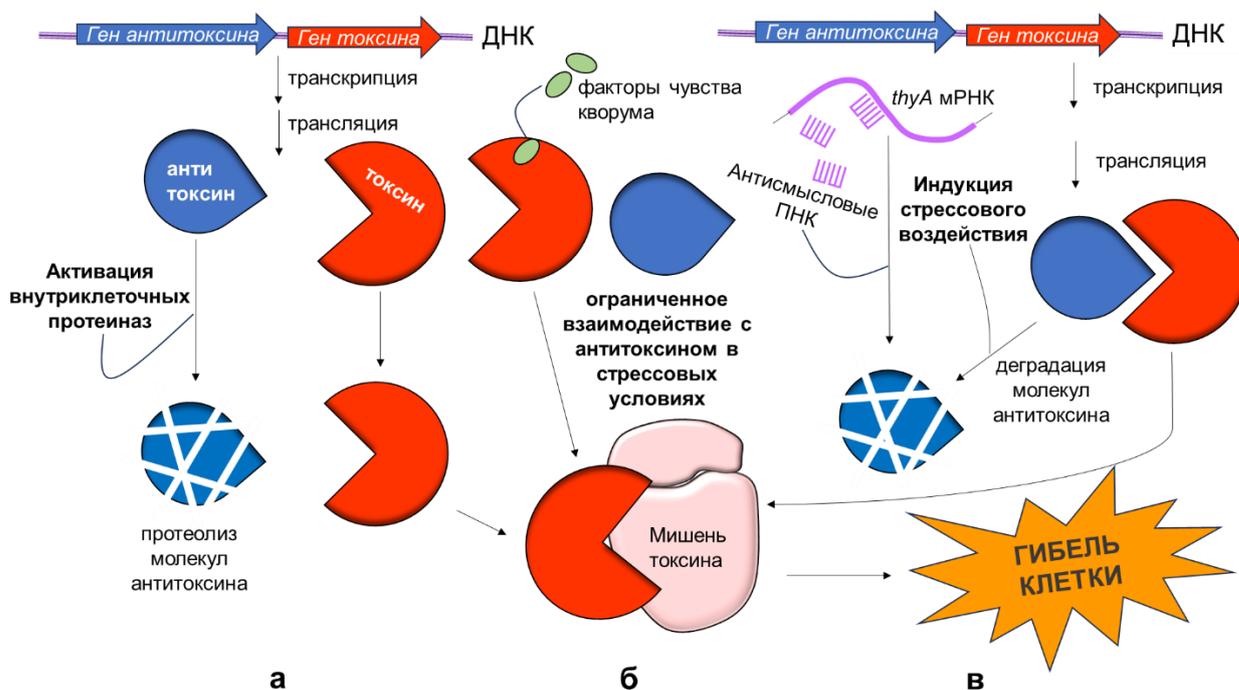
1.3.2 Способы непрямо́й активации ТА-систем

1.3.2.1. Активация экспрессии протеаз, расщепляющих антитоксины

Как упоминалось ранее, антитоксины ТА-систем II типа более восприимчивы к протеолитическому расщеплению, чем родственные им токсины. В большинстве случаев в подобных процессах деградации молекул антитоксина задействована бактериальная Lon-протеиназа, однако в случае некоторых ТА-систем в этих процессах участвует двухкомпонентная

протеиназа ClpP, действующая совместно с шаперонами ClpA или ClpX [31,179, 313].

Истощение запаса молекул антитоксина приводит к высвобождению белков-токсинов из ТА-комплексов и ослабляет транскрипционную репрессию ТА-оперонов, вызывая увеличение продукции ТА-транскриптов. Эти события изменяют стехиометрию токсин-антитоксиновых компонентов в клетке и в конечном итоге приводят к бактерицидному эффекту [314]. Следовательно, повышение уровня представленности клеточных протеиназ или создание специфических молекул, которые активировали бы эти протеиназы, могут быть многообещающей стратегией непрямого активации токсинов. Повышения уровня экспрессии протеиназы можно добиться путем введения плазмиды, несущей клонированный ген целевого фермента. Известно, что гиперэкспрессия Lon-протеиназы приводит к образованию летального фенотипа для клеток *E. coli* [315]. Однако, благодаря использованию системы индуцируемой гиперэкспрессии Lon-протеиназы, эта проблема была преодолена; также было продемонстрировано, что летальность частично зависит от ТА-системы *yefM-yoeB* [179]. В частности, было установлено, что гиперэкспрессия Lon-протеиназы запускает YoeB-зависимое расщепление мРНК, что приводит к ингибированию процессов трансляции. Это, в свою очередь, активировало токсин YoeB и ингибировало синтез нестабильного антитоксина YefM, что в конечном итоге оказалось смертельным для клеток [179] (рисунок 3а).



(а) активация протеиназ, разрушающих антитоксины; (б) активация ТА-систем с помощью факторов чувства кворума; (с) активация токсинов путём искусственной индукции стрингент-ответа

Рисунок 3 – Предлагаемые антибактериальные стратегии, основанные на непрямо́й активации токсинов ТА-систем

Протеолиз — это строго контролируемый процесс, на который могут существенно влиять специфические молекулы, мишенями которых являются протеиназы. Например, ацилдепептиды (ADEP) представляют собой соединения с антибиотическими свойствами, которые специфически активируют бактериальную протеиназу ClpP. Вызванный таким образом неконтролируемый протеолиз подавляет деление бактериальных клеток и приводит к их гибели [316].

1.3.2.2. Активация ТА-систем с помощью факторов чувства кворума

Другой любопытный подход к использованию ТА-локусов для реализации антибактериальной активности предложен в отношении ТА-системы *mazEF*, которая является одним из наиболее распространенных

бактериальных ТА-локусов [317, 318]. Как было указано в предыдущих разделах, токсин MazF представляет собой сайт-специфичную эндорибонуклеазу, которая индуцирует процессы программируемой гибели клеток в ответ на стрессовые условия окружающей среды [153], тогда как антитоксин MazE представляет собой лабильный антитоксин, который преимущественно расщепляется сериновой протеиназой ClpAP [158].

Предлагаемая стратегия включает использование недавно открытой группы секретируемых бактериями пентапептидов, называемых внеклеточными факторами гибели (EDF), которые участвуют в формировании чувства кворума и усиливают активность MazF в стрессовых условиях [317]. Интересно, что было показано, что молекулы EDF связываются непосредственно с токсином MazF сайт-специфичным образом, и это связывание, вероятно, ограничивает взаимодействие токсина с родственным ему антитоксином MazE (рисунок 3б) [318, 319]. EDF также могут стимулировать активацию гетерологичной экспрессии *mazEF* в клетках организма-хозяина, что может расширить потенциальное применение этой стратегии [318, 319].

1.3.2.3. Индукция стринжент-ответа

Ещё одна антибактериальная стратегия, включающая непрямую активацию токсинов, основана на индукции так называемого стринжент-ответа — консервативного механизма, который позволяет бактериям адаптировать свой метаболизм к недостатку питательных веществ. Многие хромосомные ТА-системы II типа, включая вышеупомянутые локусы *mazEF*, активируются в стрессовых условиях [320], и их активность приводит к перестройке клеточного метаболизма или запрограммированной гибели клеток, затрагивая часть бактериального сообщества [153].

Реакции стрингент-ответа (опосредованные сигнальной молекулой гуанозин-3,5-биспирофосфатом, ppGpp) активируются различными естественными сигналами голодания и стресса [57], а также могут быть достигнуты применением искусственных факторов, например, специфичных последовательностей ПНК, связывающихся с геном *thyA* *E. coli*, и конъюгированных с пептидом (KFF)₃K в качестве носителя, чтобы индуцировать выработку токсина MazF, вызывая тиминовое голодание [309]. Ген *thyA* кодирует тимидилат-синтазу – фермент, участвующий в метаболизме фолиевой кислоты, который в норме препятствует ингибированию роста, опосредованному действием MazF [153]. Как показано на примере *E. coli*, тиминовое голодание приводит к накоплению ppGpp в бактериальных клетках, что глобально тормозит процессы транскрипции [321]. Как следствие, ингибирование транскрипции *mazEF* приводит к высвобождению токсина MazF (рисунок 3в) [322]. Значительно сниженный уровень представленности мРНК *thyA* после добавки антисмысловых ПНК и, как следствие, ингибирование роста клеток подтвердили эффективность данной стратегии [309].

1.3.3. Инженерия ТА-систем для реализации стратегии целенаправленной гибели клетки

Инновационная стратегия целенаправленного уничтожения патогенных бактерий без ущерба для полезных членов микробиома, населяющего эукариотические организмы-хозяева, была предложена в контексте использования ТА-системы *ccdAB* [323]. Токсин CcdB, как было описано в предыдущих разделах, подавляет ДНК-гиразу – фермент, ответственный за раскручивание сверхспирализованной бактериальной ДНК [324], – индуцируя образование ковалентного комплекса GyrA-ДНК, который не может быть

разделен, тем самым способствуя разрыву ДНК и гибели клеток. Этот эффект подобен действию фторхинолоновых антибиотиков, мишенью которых также является ДНК-гираза [325].

Чтобы лучше контролировать биосинтез молекул CcdB *in vivo*, ген этого токсина был разделен на две части, каждую из которых слили с ДНК, кодирующей расщепленные интеины. Генерация функционального токсина происходит в три стадии: (1) экспрессия двух полипептидов, (2) их ассоциация и лигирование в единый белок и (3) аутосплайсинг интеина. Важным шагом в этой стратегии стало создание мобилизуемой плазмиды, содержащей гены, кодирующие антитоксин и конструкцию токсин-интеин, экспрессия которой могла независимо регулироваться в бактериях, несущих специфические факторы транскрипции. Хотя плазмиду можно было легко перенести путем конъюгации от *E. coli* к другим бактериям, токсическое действие наблюдалось исключительно у штаммов *Vibrio cholerae*. Такая специфичность хозяина была достигнута путем клонирования конструкций токсин ccdB-интеин под промотором, регулируемого активатором транскрипции ToxRS, активатором, ассоциированным с токсином, характерным для *V. cholerae* [326]. Бактериальные штаммы, лишённые ToxRS, не были затронуты, включая донорский штамм *E. coli* и непатогенные виды *Vibrio*.

Второй компонент модуля TA – ген антитоксина *ccdA* – был помещен под транскрипционный контроль репрессора *setR*. Наличие *setR* считается отличительной чертой SXT — интегративного и конъюгативного мобильного элемента *V. cholerae*, который часто включает в себя различные гены устойчивости к антибиотикам [327]. Таким образом, экспрессия гена антитоксина подавляется в клетках патогенного штамма *V. cholerae* с множественной лекарственной устойчивостью, содержащих ген *setR*, что позволяет токсину ингибировать активность ДНК-гиразы и, тем самым,

вызывать бактерицидный эффект. Однако в клетках, лишенных *setR*, происходит наработка антитоксина CcdA, нейтрализующего действие токсина. Таким образом, описанный подход позволяет видоспецифично уничтожать штаммы *V. cholerae* с антибиотикоустойчивостью, не влияя на рост других бактерий, присутствующих в смешанных популяциях. Эффективность этой стратегии была подтверждена *in vivo* в моделях на микробиоте рыб данио-рерио и личинок ракообразных, которые являются природным резервуаром для *Vibrio* spp. [323].

Хотя антимикробные стратегии на основе ТА-систем имеют большой потенциал, ещё слишком рано оценивать терапевтическую ценность активации токсинов в клинических условиях. Открытие и разработка лекарств являются трудоемкими и дорогостоящими процессами, поэтому выбор правильного подхода будет особенно важен в случае прогресса в создании новых антимикробных препаратов, принцип действия которых будет основан на активации токсинов. Также крайне важно правильно выбрать целевые ТА-локусы исходя из данных, касающихся их клинической значимости (т. е. распространённости в клинических изолятах, устойчивых к антибиотикам), эффекта, оказываемого на бактериальные клетки (бактерицидный, бактериостатический), влияния на формирование персистентные форм и образование биоплёнок, цитотоксичности для клеток человека и, наконец, необходимого способа доставки лекарств. Наиболее многообещающим видится сочетание использования активаторов токсинов с применяемыми в клинике антибиотиками, поскольку такая стратегия может стать эффективной против более широкого спектра штаммов бактерий невосприимчивых к антибиотикам [309].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Бактериальные штаммы, среды и условия роста

Все эксперименты проводились с использованием штамма *Mycobacterium smegmatis* (базоним *Mycobacterium smegmatis*) mc²155 (ATCC 700084) и его производных, которые были получены ранее [2] и были взяты из коллекции лаборатории или сконструированы в ходе данного исследования (см. раздел «Создание генетических конструкций»). При работе со штаммом *M. smegmatis* mc²155 wt-pMind-*varC* с гиперэкспрессией токсина *VarC* в качестве контрольного штамма использовался штамм *M. smegmatis* wt-pMind, несущий плазмидный вектор pMind без вставки. В экспериментах с делеционными мутантами в качестве контроля использовался штамм дикого типа (wt). Все штаммы *M. smegmatis*, использованные в текущей работе, культивировались в аэробных условиях в течение 24–30 ч при 37 °С на орбитальном шейкере с постоянным перемешиванием (200 об/мин) в пробирках, содержащих 4 мл питательной среды Nutrient Broth (Himedia, Индия). В экспериментах по определению выживаемости, а также в процессе пробоподготовки для протеомного профилирования образцы каждого штамма *M. smegmatis* сначала инокулировались с помощью бактериологической петли в пробирки с питательным бульоном Nutrient broth (Himedia, Индия) с добавкой 0,05 % реагента Твин-80, и культивировались при 37 °С, 200 об/мин в течение 24 ч. Состав среды Nutrient broth (NB): пептон – 5 г/л, хлорид натрия – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 1,5 г/л, pH 7,4 ± 0,2. Ночные культуры штаммов *M. smegmatis* переносились в колбы Эрленмейера объемом 250 мл, заполненные 100 мл питательной среды, для достижения оптической плотности ОП₆₀₀ = 0,25. Индукция экспрессии токсина *VarC*, а также токсина *MazF* осуществлялась путём добавки в среду культивирования тетрациклина

гидрохлорида (Tet) до достижения конечной концентрации 20 нг/мл. При культивировании рекомбинантных штаммов, полученных путем трансформации плазмидой pMind, в среду добавлялся гигромицин В Gold (InvivoGen, США) в концентрации 50 мкг/мл для поддержания плазмиды в клетках. Биомасса собиралась для анализа в середине экспоненциальной фазы ($OP_{600} = 0,6 - 0,9$).

В эксперименте с гетерологичной экспрессией использовался штамм *M. tuberculosis* H37Rv, культивирование которого осуществлялось в жидкой среде Middlebrook 7H9 (HiMedia, Индия) с добавлением 0,05 % Твин-80 и ADC (HiMedia, Индия) при 37 °С и 200 об/мин.

В экспериментах с моделью покоя использовался немодифицированный штамм *M. smegmatis* mc²155. Клетки сначала выращивались в питательном бульоне NB («HiMedia», Индия) в присутствии 0,05 % Твин-80 при 37 °С и 200 об/мин в течение 24 ч. Инокуляты полученных культур вносились в концентрации 10^5 – 10^6 клеток/мл в колбы с 250 мл среды Сатона (рН 7,0, для активных культур) или модифицированной среды Сатона (рН 6,0–6,2, для покоящихся культур). Модифицированная среда Сатона содержала (на литр): 0,5 г KH_2PO_4 ; 1,4 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 4 г L-аспарагина; 60 мл глицерина; 0,05 г цитрата железа(III)-аммония; 2 г цитрата натрия и 0,1 мл 1 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, а также добавку 0,05 % Твина-80. Модификация среды включала в себя снижение начального рН до 6,0–6,2 (без титрования NaOH) [328]. Культивирование проводилось в условиях 37 °С при постоянном перемешивании в течение 10–20 дней, в течение которых периодически измерялись значения рН. Биомасса активных (контрольных) культур собиралась в поздней экспоненциальной/предстационарной фазе. Покоящиеся клетки собирались после того, как культуры входили в постстационарную фазу, что сопровождалось приобретением темно-коричневой окраски и

возвращением pH среды до значений в диапазоне 6,0–6,2 через 13–15 дней культивирования. Культуры переносились в пробирки с пластиковыми крышками (50 мл) и поддерживались в статических условиях без перемешивания при комнатной температуре в течение 30 дней с момента инокуляции. Значения оптической плотности ОП₆₀₀ везде измерялись с помощью спектрофотометра DiluPhotometer (Implen, Германия).

2.2. Создание генетических конструкций

Для конструирования рекомбинантного штамма *M. smegmatis* с делецией ТА-локуса *mazEF* была использована общепринятая двухэтапная стратегия [329]. На первом этапе была произведена амплификация областей, фланкирующих локус *mazEF* (плечи L и R) с использованием пар праймеров UpMazLDel/LowMazLDel и UpMazRDel/LowMazRDel соответственно. Последовательности данных праймеров представлены в таблице 2.

Таблица 2 – праймеры, использованные для конструирования рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* $\Delta mazEF$, $\Delta vapBC\Delta mazEF$ и wt-pMind-*mazF*

Название	Нуклеотидная последовательность в направлении 5'-3'	Направление
UpMazLDel	AGAAGCTTCCGCGGATGCTGCCCAAC GAAGAC	Верхний
LowMazLDel	GAGTGCGCGGCCGGCGAAATTCGGGT GCATTCA	Нижний
UpMazRDel	ATTCGCGCCGGCCGCGCACTCCTGGTTT TTCT	Верхний
LowMazRDel	CAGGATCCACGATGGGCGGATTGTTG ACG	Нижний
UpMazFOver	CTGGGATCCGGAGGAATAGTGCGGCG CGGCGATATCTACA	Верхний
LowMazFOver	TCGACTAGTTGGCTTCGCGCTGGACTA CGAACCT	Нижний

Полученные ПЦР-продукты затем были использованы в качестве матриц для ПЦР с перекрывающимися последовательностями (использовались праймеры UpMazLDel и LowMazRDel). Полученные ампликоны размером 2126 п.н. очищались и подвергались расщеплению эндонуклеазами рестрикции HindIII и BamHI. Липкие концы расщепленных ампликонов были клонированы в плазмидный вектор p2NIL. Это привело к созданию вектора p2NIL-MazFDel, который затем был лигирован с кассетой, вырезанной из вектора pGOAL19 по сайту рестрикции PacI. Полученная плазида использовалась в конструировании делеционного мутанта, которое осуществлялось по методике, описанной Parish и Stoker [329]. Клетки *M. smegmatis* подвергались трансформации векторами методом электропорации с применением прибора MicroPulser (Bio-Rad, США). Итоговые и промежуточные генетические конструкции, а также полученный рекомбинантный штамм с делецией TA-локуса *varBC* проверялись с помощью ПЦР и анализировались методом секвенирования по Сэнгеру. Для получения двойного делеционного мутанта $\Delta varBC \Delta mazEF$ использовался аналогичный подход, с тем лишь отличием, что трансформации вектором p2NIL-MazFDel подвергались клетки штамма $\Delta varBC$.

Для конструирования рекомбинантного штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина MazF (wt-pMind-*mazF*) на первом этапе была произведена амплификация гена *mazF* на основе хромосомной ДНК клеток штамма *M. smegmatis* mc²155 методом ПЦР со специфических праймеров (последовательности праймеров представлены в таблице 2) в рамках TA-клонирования. Полученный ПЦР-продукт был визуализирован методом гель-электрофореза в 1 % агарозном геле. Целевой фрагмент был очищен с помощью набора Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя, после чего осуществлялось

лигирование полученного ампликона *mazF* с добавленным аденином на 3'-конце в плазмидный вектор pGEM-T с помощью ДНК-лигазы T4 (Promega, США) при 15 °С в течение ночи. Затем проводилось переосаждение лигазной смеси с помощью 95 % этанола, а полученная плаزمида со вставкой гена *mazF* использовалась для трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма BMH 71-18 методом электропорации с применением прибора MicroPulser (Bio-Rad, США); трансформанты затем высевались на чашки Петри с агаризованной средой NB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), а также ИПТГ (1мМ) и субстрат бета-галактозидазы X-Gal (20 мкг/мл). Чашки Петри инкубировались в течение ночи при 37 °С. Колонии бактерий, содержащие плазмиду со вставкой, были селектированы по белому цвету колоний. Для проверки наличия вставки проводилась ПЦР со специфическими праймерами. ПЦР-положительные колонии были инокулированы в жидкую питательную среду NB и культивировались в течение ночи. Из полученных бактериальных культур была выделена плазмидная ДНК с помощью набора Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя. Выделенная плазмидная ДНК была подвергнута рестрикции с помощью эндонуклеаз BamHI и SpeI. Также была произведена рестрикция плазмидного вектора pMIND с помощью тех же ферментов. Затем было осуществлено лигирование рестрицированного фрагмента в плазмидный вектор pMIND с последующим переосаждением лигазной смеси с помощью 95 % этанола, переосаждённая смесь использовалась для трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма BMH 71-18; трансформанты затем высевались на чашки Петри со средой NB, содержащей гигромицин (50 мкг/мл) в качестве селектирующего фактора. Наличие и корректность сборки полученной конструкции была проверена секвенированием, итоговая плазмида pMind со вставкой гена *mazF* применялась для трансформации

компетентных клеток *M. smegmatis* штамма mc²155; отбор трансформантов, высеянных на чашки Петри с агаризированной средой NB проводился по наличию устойчивости к гиргтомицину (50 мкг/мл) и канамицину (25 мкг/мл), содержащимся в питательной среде.

2.3. Определение минимальных ингибирующих концентраций

Рабочие растворы каждого антибиотика готовились путём двукратного разбавления исходных растворов в питательном бульоне Nutrient Broth (HiMedia, Индия). Культуры *M. smegmatis* всех исследованных штаммов культивировались в условиях, описанных выше (см. раздел «Бактериальные штаммы, среды и условия роста»), пока они не достигали середины логарифмической фазы роста. Бактериальные культуры доводились до оптической плотности $OP_{600} = 0,1$, которая измерялась с помощью спектрофотометра DiluPhotometer (Implen, Германия). Аликвоты по 100 мкл рабочего раствора каждого антибиотика распределялись по отдельным лункам 96-луночного планшета для микротитрования (Corning Inc., США), начиная с самой высокой концентрации в направлении самой низкой. Затем в каждую лунку добавлялось 100 мкл разведенных бактериальных культур, обеспечивая конечный объем 200 мкл на лунку и включая положительные и отрицательные контроли в планшете. Положительный контроль содержал только бактериальную культуру без антибиотика, тогда как отрицательный контроль содержал только рабочий раствор антибиотика без внесения инокулята. Планшеты инкубировались при 37 °С в течение 72 ч, по прошествии которых лунки визуально осматривались на наличие роста бактерий. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) определялась как самая низкая концентрация антибиотика, которая полностью ингибировала видимый рост

бактерий в лунках планшета. Эксперимент повторялся три раза для обеспечения воспроизводимости результатов и статистического анализа.

2.4. Определение выживаемости в условиях теплового шока, окислительного стресса, действия антибиотиков; измерение НВЧ

Устойчивость к тепловому шоку определялась путем сравнения числа колониобразующих единиц (КОЕ) до и после нагревания аликвот исследуемых культур объёмом 1 мл в диапазоне температур от 60 °С до 70 °С в течение 10 мин. Доля клеток, устойчивых к антибиотикам, вычислялась как отношение величин КОЕ до и после 24-часовой инкубации клеток в присутствии ципрофлоксацина (2,5 мкг/мл), тетрациклина (5 мкг/мл) и изониазида (100 мкг/мл). Выживаемость в условиях окислительного стресса определялась также по отношению значений КОЕ до и после инкубации предстационарных культур исследуемых штаммов с пероксидом водорода (H₂O₂) в концентрации 110 мМ в течение 30 мин.

Экспозиция с тетрациклином также проводилась в течение 7 дней с последующими высевами клеток через 24 ч, 48 ч и 7 суток после воздействия антибиотика. Перед высеванием обработанные клетки отмывались 50 мМ фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,0). Для определения значений КОЕ клетки высевались на чашки Петри, содержащие плотную питательную среду Nutrient Broth (Himedia, Индия), с добавкой 1,5 % агара (Himedia, Индия).

Оценка жизнеспособности клеток основывалась на их способности образовывать колонии на плотных питательных средах. Серия десятикратных разведений суспензий бактериальных клеток была приготовлена в свежей питательной среде, а затем 100 мкл каждого разведения было посеяно на чашки Петри с агаризованной (1,5 % агара) питательной средой NB. Число

колониеобразующих единиц (КОЕ) было подсчитано после 3 дней инкубации чашек Петри при 37 °С и определено как среднее значение трёх повторов. Тест на определение наиболее вероятного числа (НВЧ) проводился в 48-луночных полистироловых планшетах (Corning Inc., США), при этом каждая лунка содержала 0,9 мл питательного бульона, затем в лунки добавлялось по 0,1 мл соответствующих серийных разведений клеток, представленных в трех повторах. Планшеты инкубировали в течение 6–10 дней при 37 °С на орбитальном шейкере (со скоростью перемешивания 120 об/мин). При подсчете НВЧ клеток учитывались лунки планшета с видимым ростом бактерий. Расчетное количество клеток в 1 мл определялось с использованием стандартных статистических таблиц [330].

2.5. Фракционирование клеток

Активные и покоящиеся клетки *M. smegmatis*, а также образцы штамма с гиперэкспрессией токсина *VapC* (wt-pMind-*vapC*) и контрольного штамма (wt-pMind) собирались в процессе центрифугирования при 7000 об/мин в течение 15 мин и промывались 3 раза холодным фосфатным солевым буферным раствором (PBS), содержащим (на литр) 8 г NaCl, 0,2 г MgCl₂ и 0,24 г Na₂HPO₄ (рН 7,0). Бактериальный осадок ресуспендировался в том же буферном растворе, содержащем 0,5 % фенилметансульфонилфторида (PMSF), затем подвергался лизированию с использованием кремний-циркониевых шариков на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) в течение 30 сек, пять раз, с перерывами по 5 мин, в течение которых клетки охлаждались на льду. Бактериальный лизат осаждался при 13000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С на центрифуге с охлаждением (Eppendorf, Германия). Супернатант разделялся на мембранную и цитозольную фракции с помощью ультрацентрифугирования (Beckman, США) при 105000g и 4 °С в течение 2 ч.

Мембранные фракции промывали раствором PBS также в ходе ультрацентрифугирования. Для анализа белкового состава мембранный осадок обрабатывался, как описано в разделе «Экстракция белка». Для выделения РНК осадок ресуспендировался в холодном 100 мМ буферном растворе HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, рН 8,0), содержащем 5 мМ ЭДТА и цвиттер-ионный детергент CHAPS (3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-1-пропансульфонатгидрат (2 %)). Полученная суспензия затем смешивалась с реагентом TRIzol (Molecular Research Center, Inc., США).

2.6. Экстракция белка из клеток *M. smegmatis*

Осадки бактериальных клеток ресуспендировались в 50 мкл лизоцима (1 мг/мл) и 150 мкл 100 мМ Tris-HCl (рН=7,6) с 3 мкл смеси ингибиторов протеаз (GE Healthcare, США). Клетки разрушались с помощью кремний-циркониевых шариков диаметром 0,5 мм на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) 5 раз в течение 30 с, в перерывах между актами разрушения клеток пробирки экспонировались в течение 5 мин на льду. Для солубилизации белка к собранной суспензии добавлялся додецилсульфат натрия (Panreac, Испания) до конечной концентрации 2 %. Для разрушения дисульфидных связей также добавлялся дитиотреитол (BioRad, США) до концентрации 10 мМ. Образцы затем инкубировались при 60 °С в течение 30 мин, подвергались центрифугированию при 13000 g, 4 °С в течение 5 мин; затем супернатант, содержащий экстрагированные белки, отделялся. Измерение концентрации белка проводилось по методу Брэдфорд с использованием набора Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, США).

2.7. Трипсинолиз белковых экстрактов в геле

Образцы белковых экстрактов (по 200 мкг) наносились на 7,5 % полиакриламидный гель и разделялись с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методике Лэммли [331] при силе тока 30 мА с использованием системы PROTEAN II (Bio-Rad, США). Полученные гели затем окрашивались раствором Кумасси G-250 (Invitrogen, США). Участки геля, содержащие полосы белков вырезались в виде фрагментов размером 1×1 мм, а затем отмывались от раствора Кумасси с помощью 50 % раствора ацетонитрила в 100 мМ NH₄HCO₃. «Контрольный» кусок геля вырезался из пустой области геля и обрабатывался параллельно со всеми образцами. После того, как кусочки геля были вырезаны и сжаты путем дегидратации в ацетонитриле, который затем удалялся, их подвергали высушиванию в вакуумной центрифуге Speedvac (ThermoFisher Scientific, США), после чего добавлялся раствор 10 мМ дитиотреитола (ДТТ) в 100 мМ NH₄HCO₃, в объеме, достаточном для покрытия кусочков геля, и белки инкубировались с данным раствором в течение 1 ч при 56 °С. После охлаждения до комнатной температуры раствор ДТТ заменялся таким же объемом 55 мМ йодацетамида в 100 мМ NH₄HCO₃. После 45-минутной экспозиции при комнатной температуре в темноте кусочки геля промывались 50-100 мкл 100 мМ NH₄HCO₃ в течение 10 мин, затем подвергались дегидратации путём добавления 100 % раствора ацетонитрила с последующей инкубацией в течение 20 мин. Жидкая фаза впоследствии удалялась, а кусочки геля полностью высушивались в вакуумной центрифуге, после чего к ним добавлялся буферный раствор для трипсинолиза, содержащий 50 мМ NH₄HCO₃, 5 мМ CaCl₂ и 20 нг/мкл трипсина (Promega, США), далее происходила экспозиция с данным раствором в ледяной бане в течение 1 ч. По прошествии указанного времени образцы перемещались в термостат с

температурой 37 °С для дальнейшего ферментативного расщепления в течение ночи (не менее 16 ч). После трипсинолиза происходила трехэтапная экстракция полученных пептидов, которая включала в себя серию последовательных инкубаций образцов с растворами: а) 5 % муравьиной кислоты (2 об./об.); б) 5 % муравьиной кислоты в 50 % растворе ацетонитрила (2 об./об.); 5 % муравьиной кислоты в 75 % растворе ацетонитрила (2 об./об.). Каждая экстракция проходила при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего полученные пептидные экстракты объединялись и подвергались очистке на колонках Sep-Pak C18 (Waters, США) при комнатной температуре, а затем высушивались с помощью вакуумного концентратора Speedvac (ThermoFisher Scientific, США) и растворялись в 20 мкл раствора, содержащего 0,1 % муравьиную кислоту и 5 % ацетонитрила. Готовые экстракты использовались для масс-спектрометрического анализа.

2.8. Анализ ЖХ-МС/МС

Анализ проводился с помощью масс-спектрометра TripleTOF 5600+ с источником ионов NanoSpray III (AB Sciex, Канада), соединенным с системой NanoLC Ultra 2D+ nano-HPLC (Eksigent, Сингапур). Система ВЭЖХ была настроена в режиме ловушки-элюирования. В качестве буферного раствора для загрузки образцов и буферного раствора А использовалась смесь, состоящая из 98,9 % воды, 1 % метанола и 0,1 % муравьиной кислоты (в объемных долях). Буферный раствор В состоял из 99,9 % ацетонитрила и 0,1 % муравьиной кислоты (в объемных долях). Образцы загружались на колонку-ловушку Chrom XP C18, 3 мм, 120 А, 350 мм × 0,5 мм (Eksigent, Сингапур) при скорости потока 3,5 мкл/мин в течение 10 мин; элюирование происходило через разделительную колонку 3C18-CL-120 (3 мм, 120 А) 75 мм × 150 мм (Eksigent, Сингапур) при скорости потока 300 нл/мин и в линейном

повышающем градиенте буферного раствора В от 5 до 40 % за 120 мин. Колонка и предколонка регенерировались между каждым этапом анализа путем промывания 95 % буферным раствором В в течение 7 мин и уравнивались 5 % буферным раствором В в течение 25 мин. Между образцами, чтобы гарантировать отсутствие неполной отмывки, как колонка, так и предколонка пятикратно промывались короткими (по 5 мин) градиентами буферного раствора В с последующим уравниванием 5 % буферным раствором В в течение 25 мин.

Масс-спектры были получены в режиме положительных ионов. Информационно-зависимые эксперименты с масс-спектрометром включали в себя одно обзорное сканирование MS1, за которым следовали 50 зависимых сканирований MS2. Параметры сканирования MS1 были следующими: диапазон масс для анализа и последующего выбора ионов для анализа MS2 составлял 300–1250 m/z , время накопления сигнала составляло 250 мс. Ионы для анализа MS2 выбирались на основе интенсивности с порогом 200 имп/с и зарядовым состоянием от 2 до 5. Параметры сбора данных MS2 были следующими: разрешение квадруполя было установлено на UNIT (0,7 Да), диапазон измерения масс составлял 200–1800 m/z , оптимизация фокусировки ионного пучка была установлена для получения максимальной чувствительности, а время накопления сигнала составляло 50 мс для каждого иона-прекурсора. Активированная столкновениями диссоциация проводилась с использованием газообразного азота с изменением энергии столкновения от 25 до 55 В в течение времени накопления сигнала (50 мс). Анализируемые ионы-прекурсоры отправлялись в динамический список исключений на 15 с, чтобы собрать следующие спектры MS2 того же соединения вокруг вершины его хроматографического пика (минимальная ширина пика по всему градиенту составляла приблизительно 30 с).

2.9. Качественный и количественный протеомный анализ

Необработанные данные, полученные с масс-спектрометра, были преобразованы в файлы формата MGF (Mascot Generic Format) с помощью инструмента ProteoWizard [332]. Для эффективной идентификации белков сгенерированные списки пиков масс-спектра были проанализированы с помощью поисковых систем MASCOT v. 2.5.1 (Matrix Science Ltd, Великобритания) и X! Tandem (VENGEANCE, The Global Proteome Machine Organization). Параметры поиска в базе данных были следующими: триптический гидролиз, не более одного пропущенного сайта, допуск массы предшественника и фрагмента был установлен на уровне 20 ppm и 50 ppm соответственно. Окисление метионина было установлено как возможная модификация, карбамидометилирование цистеина как фиксированная. Для системы X! Tandem были выбраны параметры, которые позволяли быстро оценить ацетилирование N-концевого остатка белка, а также потерю аммиака глутамином или молекул воды глутаминовой кислотой на N-концевом участке пептидов. Полученные файлы были отправлены в программное обеспечение Scaffold 4 (v 4.2.1, Proteome Software, Inc, США) для проверки и дальнейшего анализа. Для идентификации белков использовались протеомные базы данных, относящиеся к геному *M. smegmatis* mc²155 (RefSeq:NC_008596.1). Для оценки локального уровня ложноположительных результатов использовался алгоритм стандартной группировки белков в масштабе эксперимента. К результатам поиска из отдельных выборок данных было установлено пороговое значение частоты ложноположительных результатов в 1 %. Для всех обнаруженных белков были установлены функциональные категории, взятые из базы данных Mycobrowser v 3.0 (<https://mycobrowser.epfl.ch/>), и субклеточные локализации, соответствующие данным из базы PSORTdb v. 4.0 (<http://db.psort.org/>), протеомные данные были сопоставлены с ортологами *M. tuberculosis* H37Rv.

Для количественного анализа необработанные файлы данных масс-спектра (файлы с расширением .wiff) были импортированы и обработаны в программном обеспечении Progenesis LC-MS v. 4.1 (Nonlinear Dynamics, Великобритания). Результаты количественного анализа пептидов были нормализованы с использованием итеративной медианной нормализации, реализованной в программном обеспечении Progenesis. Различия в представленности конкретного белка между тремя биологическими повторами всех штаммов были оценены с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Скорректированные p-значения для множественных тестов (q-значения) были вычислены с использованием метода Бенджамини–Хохберга [333].

2.10. Выделение РНК, электрофорез РНК, секвенирование Illumina

Тотальная РНК, а также РНК из мембранных и цитозольных фракций была выделена с помощью фенол-хлороформной экстракции, как описано ранее [334]. После выделения РНК была обработана ДНКазой Turbo DNase I (Life Technologies, Калифорния, США) для удаления следов геномной ДНК. Визуализация очищенной РНК была выполнена в 1 % агарозном геле в буфере ТАЕ или 1 % денатурирующем агарозном геле в 1x буфере MOPS с формальдегидом. Фрагментация РНК оценивалась с помощью программного обеспечения GelAnalyzer v.19.1 (www.gelanalyzer.com).

Образцы кДНК для секвенирования на платформе Illumina были подготовлены в соответствии с руководством по подготовке образцов для мРНК-секвенирования (часть 15018460 Rev. A), как описано ранее [335]. Секвенирование выполнялось в формате одиночных и парных прочтений на секвенаторах HiSeq 4000 и HiSeq 2500 соответственно (Illumina, США).

Образцы тотальной РНК для дальнейшего анализа методом ОТ-ПЦР были выделены с помощью коммерческого набора Rneasy Mini Kit (QIAGEN, США). После выделения экстракты РНК были обработаны ДНКазой Turbo DNase (Life Technologies, США) для устранения остатков геномной ДНК. Затем очищенную РНК визуализировали методом гель-электрофореза в 1 % агарозном геле в буфере TAE.

2.11. Обработка данных РНК-секвенирования

Чтения РНК-секвенирования проверялись на качество с помощью FastQC – инструмента для высокопроизводительного контроля качества данных секвенирования (доступно онлайн по адресу: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) и выравнивались с референсной последовательностью *M. smegmatis* mc²155 (номер доступа в GenBank NC_008596.1) с параметрами настройки Bowtie 2 –dovetail –local в случае парных прочтений [336]; аннотация гена также была получена из Mucobrowser [337]. Расчет картированных прочтений для всех генов проводился с помощью программы featureCounts из пакета Subread [338]. В последующем анализе использовались только однозначно картированные прочтения. Транскрипционные профили визуализировались с помощью геномного браузера IGV [339].

2.12. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени

Для синтеза кДНК использовалось 100 нг экстрагированной РНК в реакции вместе со случайными гексануклеотидами и обратной транскриптазой SuperScript III (ThermoFisher Scientific, США). Для проведения количественного ПЦР-анализа использовался коммерческий набор qPCRmix-NS SYBR (Евроген, Россия) вместе со специфическими праймерами с

использованием амплификатора CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Условия проведения ПЦР были следующими: 95 °С в течение 10 с, 60 °С в течение 10 с, 72 °С в течение 30 с, повтор цикла 40 раз. Последовательности специфических праймеров для ПЦР-анализа представлены в таблицах 3 и 4:

Таблица 3 – праймеры для количественного ПЦР-анализа, использованные для оценки целостности молекул 23S рРНК в ходе экспериментов

Название	Нуклеотидная последовательность в направлении 5'-3'	Направление	Локус	Координаты ампликонов в пределах 23S рРНК
591_Up	GGCCCGTGGAAT CTGCTGTGAAT	Верхний	591	469-634
591_Low	GTCGAGGGCTCT GACGGATTGTAAG	Нижний		
Uncl_Up	GGGCTGCATGGG ACCTTCGTT	Верхний	Отсутствие сайтов разрезания (контроль)	1604-1759
Uncl_Low	TCACTCGGCTATG CATCACCTCTCA	Нижний		
2163_Up	GTAAACGGCGGT GGTAACTAT	Верхний	2163	2121-2297
2163_Low	AGGTCCCGGGGT CTTTTC	Нижний		
2885_Up	GGGGGCGCCTGC TGGGTTTAGAA	Верхний	2885	2792-2923
2885_Low	GACAAGTGGTAT ACCAGAGGTTCG TCCGT	Нижний		

Таблица 4 – праймеры для количественного ПЦР-анализа, использованные для измерения уровней относительной экспрессии генов TA-локусов

Название	Нуклеотидная последовательность в направлении 5'-3'	Направление
maz_RT_F	CTCATCATCCAGGACGACCGA	Верхний
maz_RT_R	GCGTTGGCTCGATTCTGAATT	Нижний
varC_RT_F	GACACTTCTGCCCTCGTTGCCA	Верхний
varC_RT_R	CAGATACGACGCGGTGGACAT	Нижний
16SMSM_RTUp	GCAGGTCTCTGGGCTGTAAC	Верхний
16SMSM_RTLow	CGTTTACGGCATGGACTACC	Нижний

Данные, полученные в ходе ПЦР-анализа, были импортированы и обработаны в программном обеспечении LinRegPCR v. 11.0 (Академический медицинский центр, Нидерланды). Представленность целевых ампликонов рассчитывалась относительно внутреннего контроля, т. е. нерасщепленного участка 23S рРНК в экспериментах по оценке целостности данных молекул. В рамках оценки уровней экспрессии TA-локусов нормализация данных осуществлялась относительно уровня экспрессии референса, в роли которого выступал ген, кодирующий 16S рРНК.

2.13. Анализ методом удлинения праймера

Олигонуклеотид 5'-TTATCCTGTCCGAACGTGGCTATC-3' (условно обозначаемый 2929_Low), который был синтезирован для картирования сайта расщепления 23S рРНК, был также радиоактивно помечен на 5'-конце с использованием 10 мкКи [γ 32P]-АТФ и полинуклеотидкиназы T4 (Fermentas, Литва). Один микрограмм РНК, выделенной из цитозольной и мембранной фракций активных и покоящихся клеток, а также мембранных фракций образцов штамма с гиперэкспрессией VarC и контрольных культур

M. smegmatis, был гибридизован с 2-моль олигонуклеотида, упомянутого выше, а обратная транскрипция была выполнена с использованием ревертазы SuperScript III (Life Technologies, США). Синтезированные цепи кДНК были разделены в 6 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Для определения сайта расщепления 23S рРНК продукты секвенирования по Сэнгеру разделялись на четырех соседних дорожках. Секвенирование клонированного фрагмента 23S рРНК (амплифицированного с помощью праймеров 2885_Up и 2929_Low) проводилось с использованием праймера 2929_Low и набора для секвенирования ДНК Sequenase 2.0 (Affymetrix, США). Величина радиоактивного сигнала определялась путем экспонирования рентгеновской пленки.

2.14. Статистический анализ

Результаты экспериментов были воспроизведены не менее чем в трех повторах и обработаны с использованием программного обеспечения STATISTICA v.7.0 (StatSoft, США). Для определения значимости различий использовался t-критерий Стьюдента, скорректированный для множественных сравнений, при принятом уровне значимости $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель данной работы заключается в изучении роли токсин-антитоксиновых (ТА) систем в формировании устойчивости к антибиотикам у микобактерий на примере *Mycolicibacterium smegmatis* (базоним *Mycobacterium smegmatis*) – непатогенного быстрорастущего родственника возбудителя туберкулёза. Данный объект также удобен ещё и тем, что, в отличие от МТВ, имеет лишь один ТА-локус *mazEF* и не более двух ТА-систем *vapBC* (причём второй локус *vapBC* был описан сравнительно недавно, и его функциональность на данный момент еще находится в процессе изучения). 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 5). В качестве контроля использовался рекомбинантный штамм дикого типа, трансформированный плазмидой pMind без вставок (wt-pMind).

Таблица 5 – 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 <i>VarC</i>	Лабораторная коллекция
wt-pMind- <i>mazF</i>	Штамм с гиперэкспрессией токсина <i>MazF</i>	Сконструирован в ходе данной работы
$\Delta varBC$	Штамм с делецией локуса <i>varBC</i>	Лабораторная коллекция
$\Delta mazEF$	Штамм с делецией локуса <i>mazEF</i>	Сконструирован в ходе данной работы
$\Delta varBC\Delta mazEF$	Штамм с делецией локусов <i>varBC</i> и <i>mazEF</i>	Сконструирован в ходе данной работы

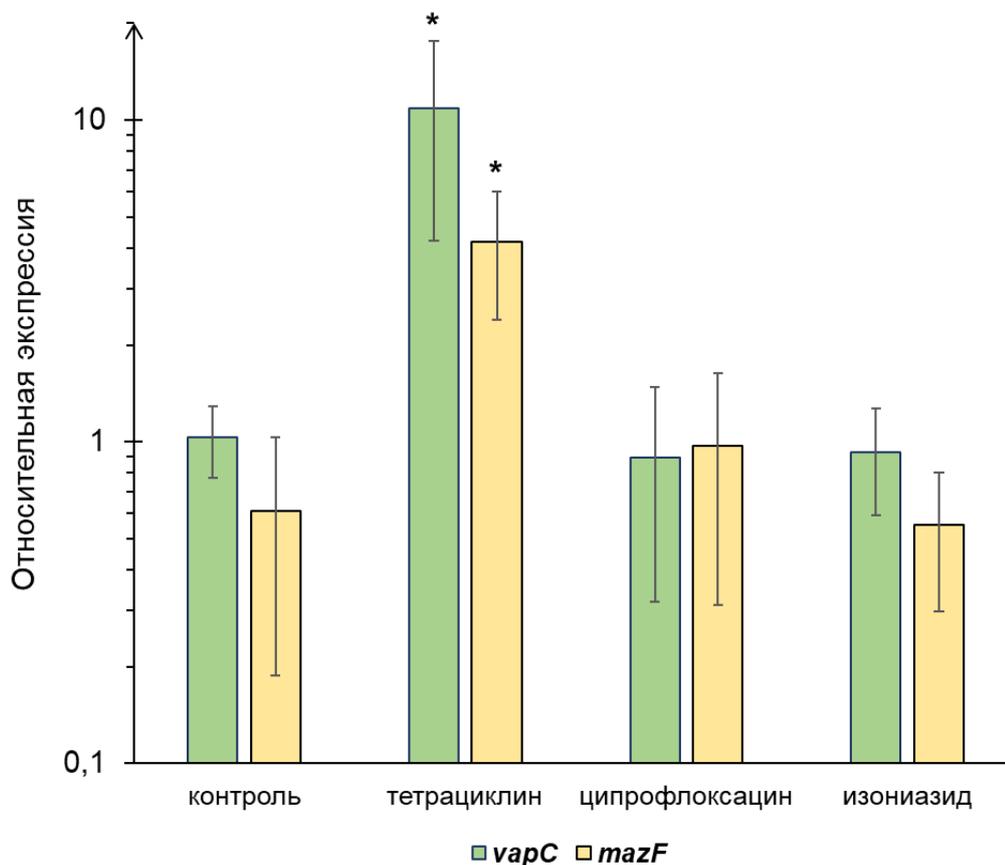
3.1. Применение антибиотика способно вызывать активацию экспрессии ТА-локусов

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 [340]. 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 [251], демонстрируя тем самым общую стрессоустойчивость. Покоящееся состояние бактерий можно рассматривать как механистическую основу персистенции [341], а персистентные бактерии, в свою очередь, могут

формироваться как спонтанно, так и в результате запуска специфического стрессового сигнала [1]. Исходя из этого, было целесообразно проверить следующую гипотезу: может ли внесение антибиотика в среду, где происходит культивирование клеток *M. smegmatis*, вызвать активацию транскрипции генов, кодирующих токсины в составе 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, мишенью ципрофлоксацина, относящегося к классу фторхинолонов, является ДНК-гираза [342]. Изониазид подавляет биосинтез компонентов клеточной стенки, поскольку ингибирует еноилредуктазу, которая катализирует реакции образования миколовых кислот [343]. В то же время под действием тетрациклина происходит блокировка процесса трансляции, поскольку данный антибиотик нарушает процесс связывания А-сайта в составе 30S-субъединицы рибосомы с аминоацил-тРНК [344]. Суммируя вышесказанное, 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 *varC* 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 *VarC* и *MazF* после введения тетрациклина. Однако добавка к анализируемым

культурам ципрофлоксацина 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 4).



Представленность мРНК генов *varC* (зеленые столбцы) и *mazF* (желтые столбцы) 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

Рисунок 4 – Результаты ОТ-ПЦР, выполненной с образцами РНК *M. smegmatis*, выделенной после двухчасового культивирования в присутствии ципрофлоксацина (2,5 мкг/мл), изониазида (100 мкг/мл) и тетрациклина (5 мкг/мл)

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

рибосомах. Полученный результат требовал дальнейшего изучения с точки зрения поиска ответа на вопрос, может ли активация ТА-локуса и повышение уровня токсинов в клетках микобактерий оказывать влияние на образование персистеров в культурах *M. smegmatis*.

3.2. Индукция гиперэкспрессии токсинов приводит к разным физиологическим эффектам

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 [2, 345]. Таким образом, было доказано, что токсин VarC принимает участие в переходе клеток *M. smegmatis* в состояние покоя. В то же время, из работ некоторых авторов известно, что токсин MazF способен контролировать процессы программируемой клеточной смерти в клетках *E. coli* [158]. Поскольку в геноме *M. smegmatis* также присутствует ТА-локус *mazEF*, была также поставлена задача изучить физиологические эффекты токсина MazF при его гиперэкспрессии в клетках микобактерий. Для этого был сконструирован рекомбинантный штамм *M. smegmatis*, несущий экспрессионную плазмиду pMind со вставкой гена *mazF*. Для сравнения фенотипов обоих штаммов – с гиперэкспрессией токсина VarC и MazF – их культуры выращивались в среде Nutrient Broth (“HiMedia”, Индия) с добавлением индуктора – тетрациклина гидрохлорида с конечной концентрацией 20 нг/мл. Каждые сутки производились высевы на чашки

Петри с агаризованной средой Nutrient Broth для определения величины числа КОЕ. Результаты представлены на рисунке 5.

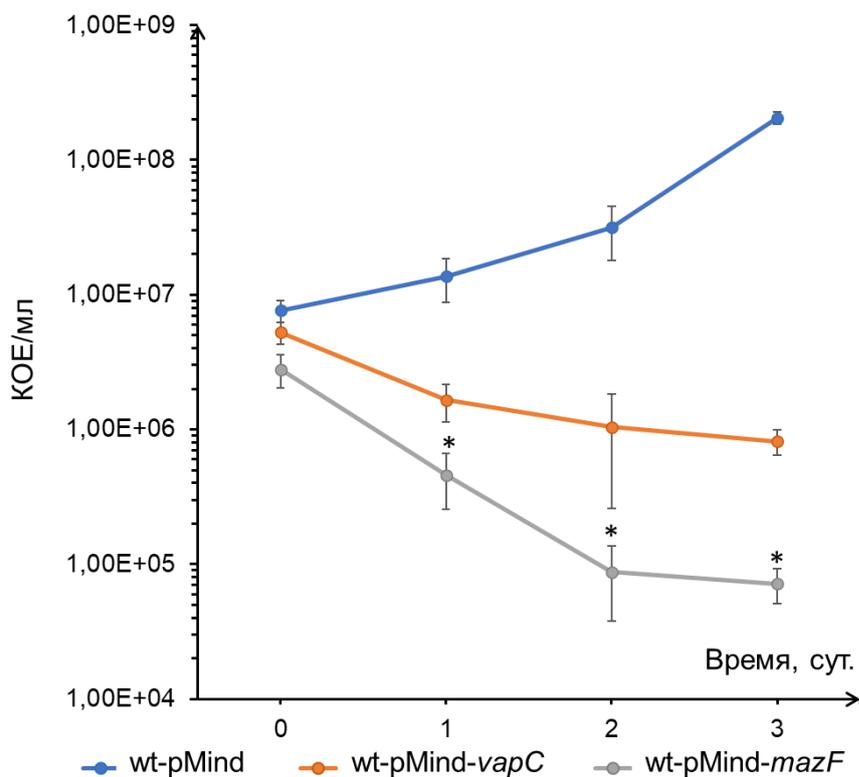


Рисунок 5 – Оценка выживаемости рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* в условиях индукции гиперэкспрессии токсинов *VapC* и *MazF* тетрациклином гидрохлоридом (20 нг/мл)

По итогам подсчёта колоний на чашках с целью определения динамики изменения величин КОЕ анализируемых штаммов в условиях добавки индуктора было зафиксировано падение числа КОЕ для штаммов с гиперэкспрессией как токсина *VapC*, так и токсина *MazF* по сравнению с контролем, причём для гиперэкспрессии *MazF* данный результат оказался статистически значимым при множественном сравнении с применением критерия Краскела-Уоллиса и составил $2,56 \% \pm 0,49 \%$ на третьи сутки измерений по сравнению с исходной точкой засева культур. При этом контрольный штамм *wt-pMind* демонстрировал рост с формированием характерной экспоненциальной кривой. Различия кривых динамики

изменения величин КОЕ в условиях индукции гиперэкспрессии токсинов свидетельствуют в пользу того, что токсины *VapC* и *MazF* играют различную роль в физиологии микобактериальных клеток. Как видно из результатов проведенного эксперимента, повышенная внутриклеточная концентрация токсина *MazF* приводит к гибели популяции бактерий, в то время как увеличение наработки клетками токсина *VapC* вызывает остановку роста культуры, что коррелирует с литературными данными и, по-видимому, связано с участием *VapC* в процессе перехода клеток в состояние покоя [2]. Появление фенотипа, характеризующегося сниженной скоростью роста (*wt-pMind-vapC*), свидетельствует о глобальных физиологических изменениях в клетках данного штамма, что, в отличие от летального фенотипа *wt-pMind-mazF* может быть связано с вызванными токсином *VapC* метаболическими перестройками в рамках перенаправления белкового синтеза, что стало предметом дальнейшего изучения.

3.3. Протеомное профилирование штамма с гиперэкспрессией *VapC* демонстрирует изменения белкового состава

Чтобы оценить степень и характер влияния гиперэкспрессии токсина *VapC* на белковый состав клеток *M. smegmatis* было проведено протеомное профилирование образцов штамма *M. smegmatis wt-pMind-vapC* 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.

3.3.1. Анализ генной онтологии

Для полученных протеомных профилей был осуществлён анализ генной онтологии на основе данных из базы PANTHER (<https://www.pantherdb.org/>). Генная онтология (ГО, а также GO) — крупный биоинформатический проект по унификации представления атрибутов генов и их продуктов (белков) для всех видов организмов [346]. Если более конкретно, то проект направлен на: 1) поддержание и развитие системы контролируемой номенклатуры атрибутов генов и белков; 2) аннотирование генов и белков, ассимиляцию и распространение данных аннотаций; а также 3) обеспечение инструментов для интерпретации экспериментальных данных, например, в рамках анализа обогащения функциональных групп белков [347].

В ходе данного исследования анализ генной онтологии позволил визуализировать в пределах полученных протеомных профилей паттерны перераспределения определённых функциональных групп белков под действием гиперэкспрессии токсина *VarC* в сравнении с контролем. Ниже представлены результаты оценки изменения представленности групп белков в категориях «Клеточные компоненты», «Молекулярные функции» и «Биологические процессы».

В категории ГО «Клеточные компоненты» наблюдается увеличение представленности белков с аннотациями принадлежности к мембранной фракции (в частности, «GO:0016020 membrane», «GO:0031224 intrinsic component of membrane»), а также выделяется группа рибосомальных белков («GO:0005840 ribosome») и белков, заякоренных на мембране («GO:0043228

non-membrane-bounded organelle»). Более подробно результаты в этой категории в количественном выражении представлены на рисунке 6.

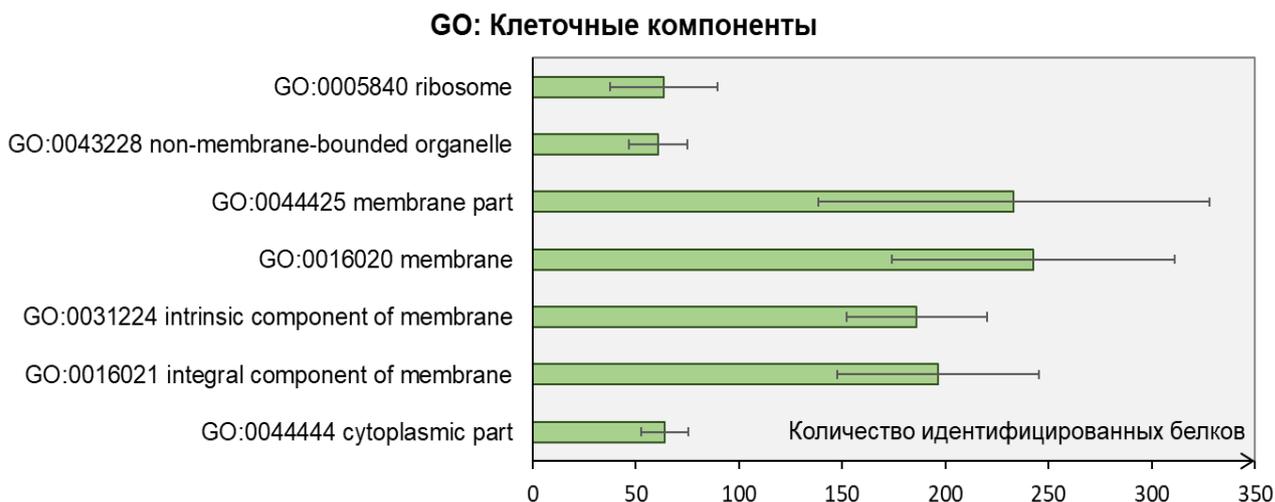


Рисунок 6 – Функциональные группы белков с увеличенной представленностью в категории GO «Клеточные компоненты» в условиях гиперэкспрессии токсина VarC по отношению к контролю

Среди идентифицированных белков в категории GO «Молекулярные функции» обращают на себя внимание группы белков с увеличенной представленностью, которые были аннотированы по их способности связываться с нуклеиновыми кислотами, в частности, с ДНК и рРНК: сюда, например, относятся подкатегории «GO:0003676 nucleic acid binding», «GO:0003677 DNA binding» и «GO:0019843 rRNA binding». Другие высокопредставленные группы идентифицированных белков связаны с сигналингом («GO:0038023 signaling receptor activity»), регуляцией транскрипции («GO:0003700 transcription factor activity») и формированием стрессового ответа посредством активности протеинкиназ («GO:0004672 protein kinase activity»). Визуализация вышеупомянутых подкатегорий с указанием среднего количества высокопредставленных белков в каждой функциональной группе отображена на рисунке 7.

GO: Молекулярные функции

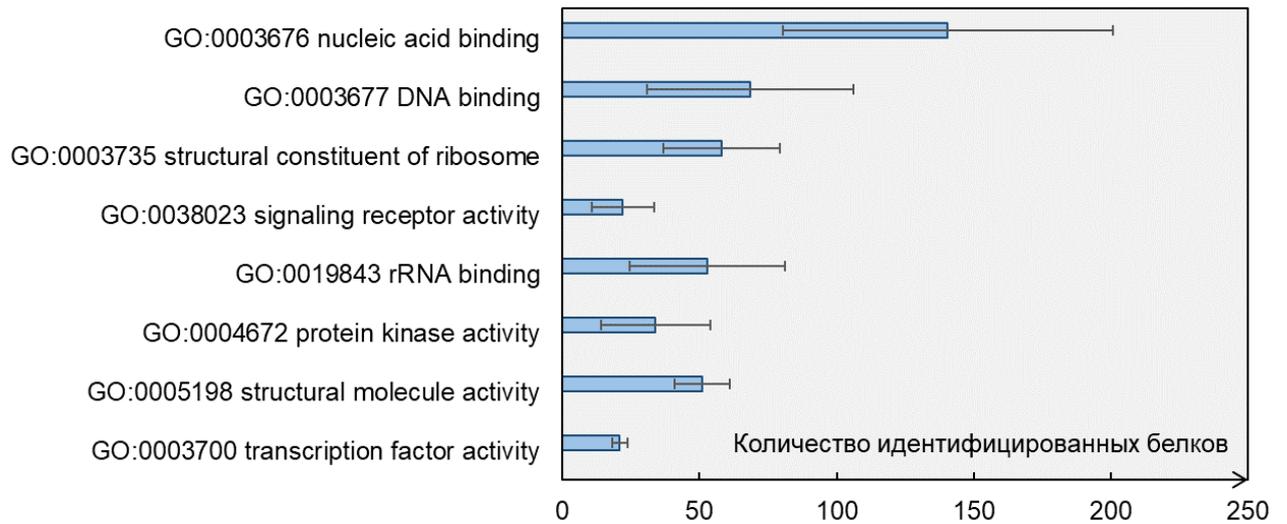


Рисунок 7 – Функциональные группы белков с увеличенной представленностью в категории ГО «Молекулярные функции» в условиях гиперэкспрессии токсина VarC по отношению к контролю

Наконец, в категории генной онтологии «Биологический процесс» группы белков аннотированы по их функциям и ролям в метаболических процессах. В рамках анализа полученных протеомных профилей среди высокопредставленных функциональных групп белков выделяются аннотированные как участвующие в процессинге нуклеиновых кислот («GO:0090304 nucleic acid metabolic process»), и, в частности, РНК («GO:0016070 RNA metabolic process»). Кроме того, выделяются группы белков, задействованные в регуляторных процессах («GO:0065007 biological regulation»), в том числе в регуляции транскрипции («GO:0034654 nucleobase-containing compound biosynthetic process»), и формировании стрессового ответа («GO:0006950 response to stress»). Детали представлены на рисунке 8.

GO: Биологические процессы

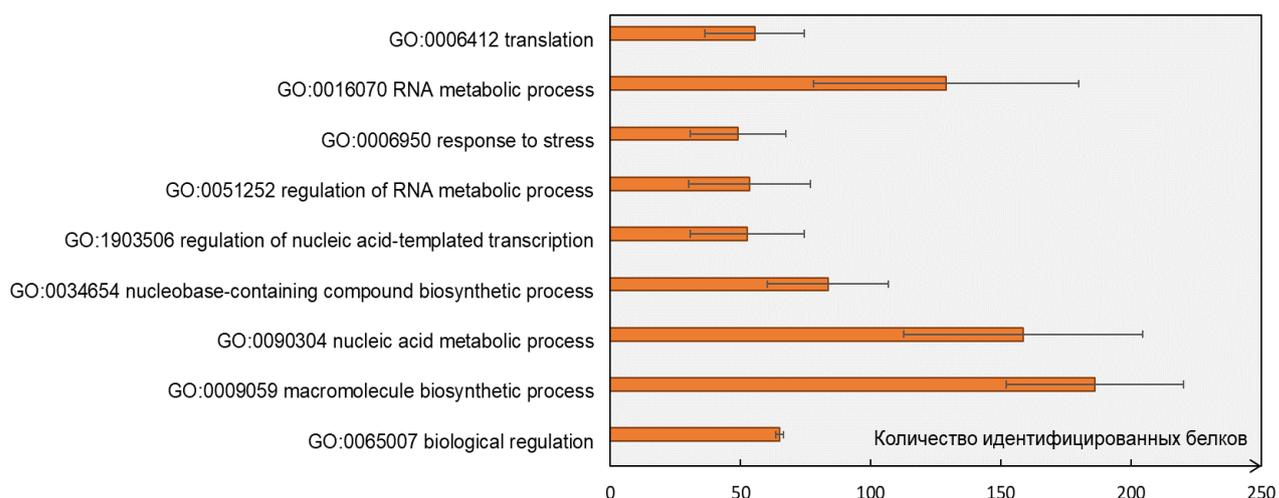


Рисунок 8 – Функциональные группы белков с увеличенной представленностью в категории GO «Биологические процессы» в условиях гиперэкспрессии токсина VarC по отношению к контролю

Таким образом, анализ геной онтологии показывает наличие общего перераспределения в функциональных группах белков, вызванного гиперэкспрессией токсина, во всех анализируемых категориях. Это подтверждает предположение о том, что под действием токсина VarC в клетках *M. smegmatis* происходят метаболические и структурные перестройки. Чтобы более детально оценить характер этих перестроек уже на уровне изменения представленности единичных белков был проведён количественный протеомный анализ.

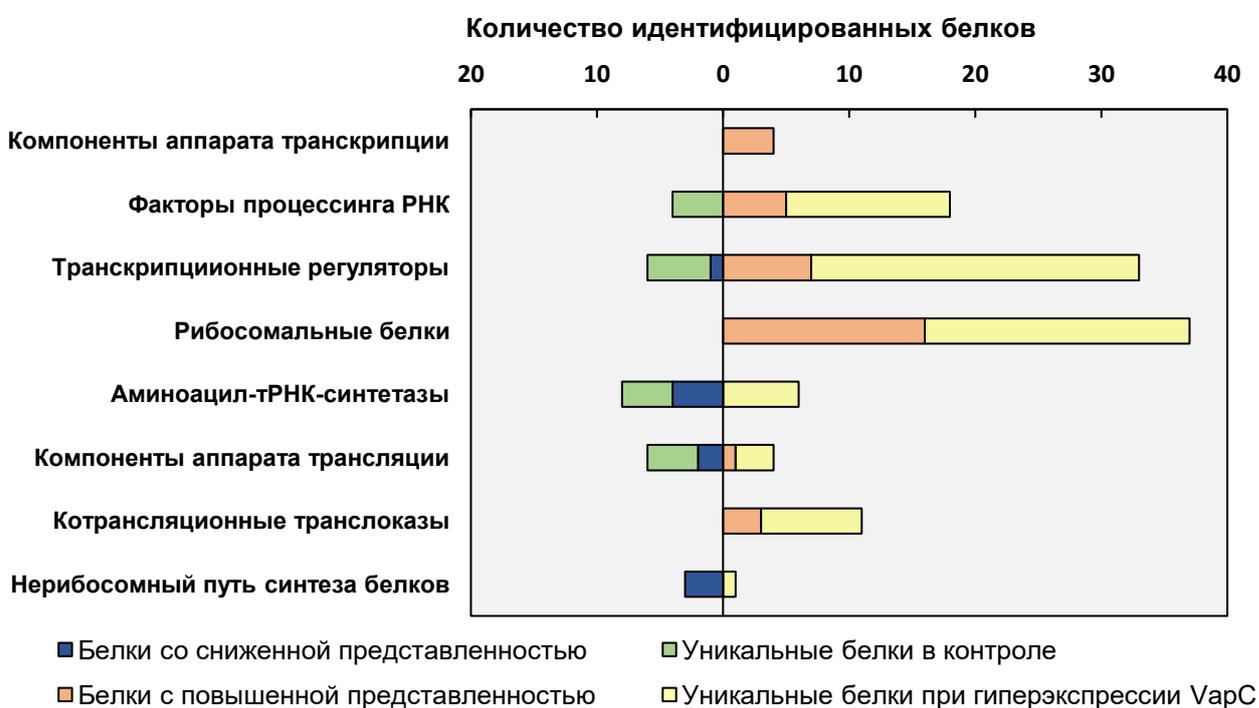
3.3.2. Количественный протеомный анализ

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.

3.3.2.1. Перераспределение белков, входящих в аппарат трансляции

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-varC наиболее заметное перераспределение было выявлено для групп белков, задействованных в трансляционном аппарате (рисунок 9).



Дифференциальные белки протеомного профиля штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией VarC были объединены с фракциями уникальных

полипептидов, идентифицированных в образцах штаммов wt-pMind и wt-pMind-*varC*

Рисунок 9 – Обобщенная схема, отражающая изменения в представленности функциональных групп белков, вовлеченных в процесс биосинтеза белка, в мембранной фракции протеомного профиля штамма wt-pMind-*varC*

Выше представленная диаграмма представляют собой результат компиляции данных об идентифицированных дифференциальных и уникальных белках, представленных в разделе «Приложения» (приложение 1 – 3). Как видно из рисунка 9, в мембранной фракции белкового профиля образцов штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией *VarC* 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 аминоктил-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). Среди дифференциальных белков с повышенной представленностью оказалось несколько регуляторов топологии молекул ДНК (ДНК-топоизомеразы I MSMEG_6157, некоторые субъединицы ДНК-гиразы B MSMEG_0005, а также ДНК-связывающего белка HU MSMEG_2389). Одновременно с этим белки, участвующие в процессе транскрипции (ДНК-хеликаза MSMEG_2403, две субъединицы РНК-полимеразы MSMEG_1524 и MSMEG_1368, терминатор транскрипции Rho MSMEG_4954), транскрипционные регуляторы (всего 7 различных белков и некоторые белки, способствующие процессингу молекул РНК (DEAD/DEAH хеликазы MSMEG_1930 и MSMEG_1254, фактор von Willebrand A MSMEG_5511 и другие) обладали повышенной представленностью в условиях гиперэкспрессии токсина *VarC*. Более подробная информация о всех

дифференциальных белках и изменениях их представленности отображена в приложении 1.

Результаты анализа представленности дифференциальных полипептидов также были дополнены данными об уникальных белках, обнаруженных в образцах контрольного (wt-pMind) и анализируемого штамма (wt-pMind-*varC*), что также отображено на рисунке 9. Таким образом, в мембранной фракции белкового профиля образцов штамма wt-pMind-*varC* 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 VarC: 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 ресайклинга 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 препротейиновых 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 препротейинтранслоказы 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). Данные об уникальных белках, идентифицированных в образцах как штамма wt-pMind-*varC*, так и штамма wt-pMind, оформлены в виде приложений (см. приложение 2 и 3 соответственно).

Таким образом, количественный протеомный анализ продемонстрировал, что во фракции мембранных белков *M. smegmatis* в условиях гиперэкспрессии VarC происходит накопление рибосомальных белков наряду с компонентами Sec-комплекса, сопровождающееся снижением содержания аминоксил-тРНК-синтетаз, факторов элонгации трансляции и высвобождения полипептидных цепей и ферментов нерибосомного синтеза пептидов.

3.3.2.2. Метаболические перестройки при гиперэкспрессии VarC

Дальнейший анализ данных протеомного профилирования осуществлялся в контексте изменений представленности белков, участвующих в метаболических процессах и формировании стрессового ответа в культурах *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина VarC. В процессе количественного анализа протеомных профилей были отобраны отдельные полипептиды, которые были идентифицированы во всех исследованных образцах. В сравнительном анализе рассматривались только дифференциальные полипептиды, то есть те белки, представленность которых при гиперэкспрессии токсина VarC увеличилась или уменьшилась как минимум в два раза и более по сравнению с контрольными образцами дикого типа.

Детальный анализ протеомных данных позволил отследить определенные изменения в первичных метаболических и регуляторных процессах в условиях гиперэкспрессии VarC. Результаты количественной оценки изменений представленности белков в протеомных профилях опытных

образцов в сравнении с контролем в числовом выражении отображены в таблице 6. 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. Данные о представленности белков, участвующих в метаболизме аминокислот при гиперэкспрессии токсина VarC, показали снижение представленности среди ферментов синтаз, таких как триптофансинтаза MSMEG_3220, аспарагинсинтаза MSMEG_2594, метионинсинтаза MSMEG_4185, карбамоилфосфатсинтаза MSMEG_3047 и других (всего девять ферментов). Однако относительная представленность глутаминсинтазы MSMEG_4290 была в 94 раза выше по сравнению с контролем. Более того, три фермента катаболизма аминокислот обладали сниженной представленностью, а еще два белка в этой категории – повышенной (см. таблицу 6).

Таблица 6 – Функциональные кластеры дифференциальных белков, обсуждаемых в тексте. Белки со сниженной представленностью выделены оттенками красного, а белки с повышенной – оттенками зеленого, в соответствии с кратностью изменений. Основные категории генной онтологии (GO) выделены жирным шрифтом

Ген	Синоним	Продукт	Кратность изменений	Уровень значимости	Метаболические пути
GO: 0005975 процессы метаболизма углеводов					
MSMEG_3227	pyk	пируваткиназа	0,13	0,000007	Гликолиз
MSMEG_2280	-	пируватдегидрогеназа	0,45	0,004961	Гликолиз
MSMEG_4323	aceE	пируватдегидрогеназа субъединица E1	0,37	0,000609	Гликолиз
MSMEG_0903	lpdA	дигидролипоамид дегидрогеназа	0,17	0,000073	Гликолиз
MSMEG_1735	-	дигидролипоамид дегидрогеназа	0,21	0,000005	Гликолиз
MSMEG_3143	asnA	аконитатгидратаза	0,03	0,000053	Цикл трикарбоновых кислот
MSMEG_5240	fumC	фумаратгидратаза	0,45	0,000087	Цикл трикарбоновых кислот
MSMEG_5672	gltA	цитратсинтаза II типа	5,43	0,027504	Цикл трикарбоновых кислот
MSMEG_3103	tkt	транскетолаза	0,16	0,000000	Пентозофосфатный шунт
MSMEG_3706	aceA	изоцитратлиаза	2,11	0,003163	Глиоксилатный цикл
MSMEG_0911	aceA	изоцитратлиаза	0,38	0,000069	Глиоксилатный цикл
GO: 0006807 процессы метаболизма азотсодержащих соединений					
MSMEG_0889	-	сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	26,76	0,000001	Шунт γ -аминомасляной кислоты
MSMEG_6452	-	[НАДФ ⁺] сукцинат-полуальдегиддегидрогеназа	0,11	0,0000001	Шунт γ -аминомасляной кислоты
MSMEG_1574	-	глутаматдекарбоксилаза	4,83	0,000013	Промежуточный метаболизм
MSMEG_4290	glnA	глутаминсинтаза	93,70	0,000000	Метаболизм азотсодержащих соединений
MSMEG_0969	hemL	глутамат-1-полуальдегидаминотрансфераза	5,13	0,009977	Биосинтез порфиринов
GO: 0006520 процессы метаболизма аминокислот					
MSMEG_1179	hutU	уроканатгидратаза	0,04	0,000004	Катаболизм аминокислот
MSMEG_3642	gcvP	глициндегидрогеназа	0,35	0,000505	Катаболизм аминокислот
MSMEG_3594	-	антранилатдиоксигеназа-редуктаза	0,15	0,000022	Катаболизм аминокислот
MSMEG_6291	-	дегидрогеназа D-аминокислот	12,70	0,013200	Катаболизм аминокислот
MSMEG_4281	-	лейциламинопептидаза	4,24	0,000008	Катаболизм аминокислот
MSMEG_3220	trpB	бета-субъединица триптофансинтазы	0,30	0,007160	Биосинтез аминокислот
MSMEG_2378	serA	D-3-фосфоглицератдегидрогеназа	0,14	0,000010	Биосинтез аминокислот
MSMEG_1413	rocD	трансаминаза орнитин-оксокислот	0,12	0,0000001	Биосинтез аминокислот
MSMEG_2594	asnB	аспарагинсинтаза	0,09	0,000001	Биосинтез аминокислот
MSMEG_4584	proA	гамма-глутамилфосфатредуктаза	0,30	0,006243	Биосинтез аминокислот
MSMEG_4185	metH	B12-зависимая метионинсинтаза	0,05	0,000057	Биосинтез аминокислот
MSMEG_5684	-	фосфосеринаминотрансфераза	0,27	0,000468	Биосинтез аминокислот
MSMEG_3047	carB	большая субъединица карбамоилфосфатсинтазы	0,07	0,001002	Биосинтез аминокислот
MSMEG_5270	-	цистатинин бета-синтаза	0,27	0,000189	Биосинтез аминокислот
GO: 0006629 процессы метаболизма липидов					
MSMEG_0373	-	ацетил-КоА-ацетилтрансфераза	84,54	0,009146	Метаболизм липидов
MSMEG_6391	-	бета-субъединица пропионил-КоА-карбоксилазы	68,53	0,0000003	Метаболизм липидов
MSMEG_3767	-	ацил-КоА-синтаза	3,26	0,000002	Метаболизм липидов
MSMEG_0599	-	ацил-КоА-синтаза	11,61	0,000007	Метаболизм липидов
MSMEG_1813	-	бета-субъединица пропионил-КоА-карбоксилазы	3,57	0,001675	Метаболизм липидов
MSMEG_4705	-	ацилтрансфераза	0,07	0,000000003	Метаболизм липидов
MSMEG_0131	-	КоА-лигаза-длинноцепочечных жирных кислот	0,02	0,000031	Катаболизм жирных кислот
MSMEG_6393	-	КоА-лигаза-длинноцепочечных жирных кислот	0,05	0,000001	Катаболизм жирных кислот
MSMEG_4299	-	еноил-КоА-гидратаза/изомераза	0,03	0,038669	Катаболизм жирных кислот
MSMEG_4329	-	бета-субъединица пропионил-КоА-карбоксилазы	0,43	0,000442	Катаболизм жирных кислот
MSMEG_5273	-	ацетил-КоА-ацетилтрансфераза	0,20	0,000001	Катаболизм жирных кислот
MSMEG_5650	-	АМФ-зависимая синтаза/лигаза	0,02	0,0000001	Катаболизм жирных кислот
MSMEG_0372	fabG	3-кетоацил-АПБ-редуктаза	10,78	0,000003	Биосинтез жирных кислот
MSMEG_4757	-	синтаза жирных кислот	16,57	0,000525	Биосинтез жирных кислот
MSMEG_6284	-	циклопропансинтаза жирных кислот	22,69	0,000066	Биосинтез жирных кислот
MSMEG_5086	-	синтаза ацил-КоА длинноцепочечных жирных кислот	8,03	0,000452	Биосинтез жирных кислот
MSMEG_4716	-	ацетил/пропионил-кофактор А карбоксилаза субъединица α	7,27	0,000002	Биосинтез жирных кислот
MSMEG_1807	-	ацетил/пропионил-кофактор А карбоксилаза субъединица α	33,04	0,002850	Биосинтез жирных кислот
MSMEG_4328	-	3-оксоацил-АПБ-синтаза	4,37	0,000010	Биосинтез жирных кислот, биогенез клеточной стенки
MSMEG_4327	-	3-оксоацил-АПБ-синтаза	9,25	0,004807	Биосинтез жирных кислот, биогенез клеточной стенки
GO: 0006139 процессы метаболизма соединений, содержащих нуклеиновые основания					
MSMEG_5852	purD	фосфорибозиламин-глициллигаза	0,12	0,000002	Биосинтез пуринов
MSMEG_5515	purH	бифункциональный белок биосинтеза пуринов PurH	0,06	0,000001	Биосинтез пуринов
MSMEG_5824	purL	фосфорибозилформилглициламиндинсинтаза II	0,02	0,000121	Биосинтез пуринов
MSMEG_1602	guaB	инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа	6,56	0,018145	Метаболизм нуклеотидов
MSMEG_3746	pyrG	ЦТФ-синтаза	2,26	0,0000004	Метаболизм нуклеотидов
MSMEG_3634	-	инозин-5-монофосфатдегидрогеназа	11,38	0,000673	Метаболизм нуклеотидов
MSMEG_1603	-	инозин-5-монофосфатдегидрогеназа	5,28	0,013998	Метаболизм нуклеотидов
GO: 0006950 стрессовый ответ					
MSMEG_3461	katG	каталаза/пероксидаза HPI	0,26	0,000134	Ответ на окислительный стресс
MSMEG_2965	relA	ГТФ пиррофосфокиназа	4,12	0,000005	Строгий стрессовый ответ
MSMEG_4672	clpP	АТФ-зависимая субъединица Clp-протеазы	2,33	0,001744	Стрессовый ответ
MSMEG_0709	dnaK	молекулярный шаперон DnaK	0,43	0,003937	Белковый рефолдинг, стрессовый ответ
MSMEG_0880	groEL	молекулярный шаперон GroEL	0,23	0,000001	Белковый рефолдинг, ответ на тепловой шок
MSMEG_0732	-	шаперон ClpB	0,04	0,000059	Белковый рефолдинг, ответ на тепловой шок
MSMEG_3122	sufB	фактор сборки FeS-комплекса SufB	0,21	0,000003	Ответ на окислительный стресс
MSMEG_3124	sufC	фактор сборки FeS-комплекса SufC	0,11	0,018956	Ответ на окислительный стресс
MSMEG_1516	-	тиоредоксинредуктаза	0,43	0,000043	Ответ на окислительный стресс
MSMEG_2259	-	белок углеродного голодания A	29,17	0,000032	Стрессовый ответ

Гиперэкспрессия VarC также повлияла на представленность ряда ферментов, участвующих в биосинтезе жирных кислот, и большинство из них были увеличены в своей представленности, тогда как отдельные ферменты, связанные с путями деградации жирных кислот, были в значительной степени снижены в своей представленности по сравнению с контролем. Помимо этого, ацетил-КоА-ацетилтрансфераза MSMEG_5273 была заменена изоферментом MSMEG_0373 в условиях гиперэкспрессии VarC, и её относительная представленность была почти в 85 раз выше по сравнению с контролем (таблица 6).

Кроме того, было обнаружено, что три фермента, кодируемые генами *pur*, обладали сниженной представленностью, согласно данным протеомного профилирования, что означает, что гиперэкспрессия VarC также могла повлиять на метаболизм нуклеотидов. В то же время, три изоформы инозин-5-монофосфатдегидрогеназы обладали повышенной представленностью. Примечательной находкой стало увеличение представленности белка HemL (MSMEG_0969), который задействован в биосинтезе тетрапиррола и, таким образом, участвует в биосинтезе порфиринов (таблица 6).

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. Еще одной находкой,

заслуживающей упоминания, стала замена различных белков, участвующих в реакции на окислительный стресс на их изоформы в полученных протеомных профилях: так, например, марганец-супероксиддисмутаза (MSMEG_6636) была заменена супероксиддисмутазой, связывающей ионы меди и цинка (MSMEG_0835), а каталаза/пероксидаза KatG HPI MSMEG_3461 была заменена изоферментом MSMEG_6384. Кроме того, такие белки, косвенно участвующие в борьбе с окислительным стрессом, как тиолпероксидаза (MSMEG_3479), а также микотиол-зависимая формальдегиддегидрогеназа (MSMEG_4340) по итогам протеомного профилирования были идентифицированы как уникальные для контроля, то есть они были обнаружены в образцах дикого типа, но не среди белков в протеомных профилях штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина VarC.

Наконец, протеомное профилирование образцов с гиперэкспрессией токсина VarC 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, то есть были обнаружены только в протеомных профилях штамма с гиперэкспрессией VarC, но не в контрольных образцах штамма дикого типа.

Таким образом, наиболее значимым при анализе полученных протеомных профилей стало наблюдение резкого увеличения представленности рибосомальных белков при гиперэкспрессии VarC (рисунок 9), сопровождающееся ростом представленности препротеиновой транслоказы SecA и идентификацией ряда Sec-белков, участвующих в котрансляционной транслокации, в качестве уникальных белков в протеомном

профиле штамма *wt-pMind-varC*. 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 [348]. Трансляция у прокариот обычно сопряжена с транскрипцией и осуществляется на полисомах [349, 350]. Таким образом, обнаруженное увеличение представленности белков, связанных с транскрипцией, регуляцией транскрипции, белками процессинга РНК и регуляцией топологии ДНК, может быть результатом ассоциации рибосом с мембраной в форме полисом.

Следует подчеркнуть, что обнаруженное снижение представленности четырёх аминоксил-тРНК-синтетаз в условиях гиперэкспрессии *VarC*, в то время как ещё четыре из них не были обнаружены вовсе в сравнении с контролем, наталкивает на идею о пониженном содержании комплексов аминоксил-тРНК с рибосомами и увеличении доли молекул тРНК, не несущих аминокислотные остатки. С одной стороны, это должно было бы привести к ограничению синтеза белка или даже его остановке. С другой стороны, это вызвало активацию (p)ppGpp-синтазы RelA (которая также была высоко представлена в образцах с гиперэкспрессией *VarC*) и развитие стрингент-ответа, что способствовало дальнейшему ингибированию трансляции [351]. Процесс сопровождался увеличением представленности фактора инициации трансляции IF-2, в то время как триггер-фактор Tig и фактор элонгации трансляции Tu продемонстрировали снижение; также фактор, способствующий гибернации (HPF), был идентифицирован как уникальный белок, в то же время фактор рециркуляции рибосом Frr не был обнаружен в

протеомном профиле клеток с гиперэкспрессией VarC по сравнению с контролем (приложение 3). Таким образом, предполагаемые мембранно-ассоциированные рибосомы, по-видимому, были нефункциональными и преимущественно оставались законсервированы на стадии инициации трансляции, но не элонгации.

Протеомное профилирование является ценным инструментом для прогнозирования физиологических характеристик бактериальных клеток в определенных условиях. В рамках данного исследования проводилось сравнение дифференциальных белков в клетках *M. smegmatis*, гиперэкспрессирующих токсин VarC, и в клетках образцов штамма дикого типа, в ходе которого осуществлялся анализ выделенного спектра белков с позиций их участия в стрессовых реакциях. В частности, было зафиксировано снижение представленности белков, вовлечённых в метаболизм углеводов, таких как пируваткиназа, пируватдегидрогеназа, аконитатгидратаза и фумаратгидратаза, но при этом было обнаружено увеличение представленности цитратсинтазы. Некоторые ферменты также были заменены на их изоформы, (например, изоцитратлиаза и сукцинатполуальдегиддегидрогеназа). Эти изменения, в частности, предполагают активацию глиоксилатного шунта и шунта 4-аминомасляной кислоты (которые являются обходными путями цикла трикарбоновых кислот), что указывает на то, что клетки готовятся к стационарной фазе и потенциально входят в состояние покоя [352, 353]. Кроме того, наблюдалось увеличение представленности белков, участвующих в биосинтезе жирных кислот (по меньшей мере восемь белков с повышенной представленностью), и уменьшение количества ферментов, участвующих в катаболизме жирных кислот (шесть белков со сниженной представленностью). Это предполагает, что бактерии могут накапливать жирные кислоты в форме триацилглицеридов

для противодействия стрессовым условиям, таким как гипоксия и голодание по питательным веществам, которые часто встречаются во время стационарной фазы и развития состояния покоя [354, 355]. Кроме того, было показано увеличение представленности белка HemL, который участвует в биосинтезе порфирина, а накопление порфирина, в свою очередь, является характеристикой покоящихся клеток *M. smegmatis* [356], что дополнительно подтверждает предположение о том, что клетки переходят в стационарную фазу и развивают состояние покоя. С другой стороны, данный переход обычно связан с активацией общей реакции клетки на стресс [357]. Интересно, что гиперэкспрессия токсина VapC привела к аналогичным изменениям на протеомном уровне. В частности, было обнаружено увеличение представленности субъединицы протеазы ClpP, сопровождающееся идентификацией субъединицы ClpX в качестве уникального белка. Это предполагает активацию протеолиза, расщепление несвёрнутых и неправильно свёрнутых белков, а также полипептидов с прерванным синтезом [358]. Однако бактериальные клетки обычно пытаются осуществить рефолдинг поврежденных и денатурированных белков, прежде чем прибегнуть к протеолизу. Поэтому можно было бы ожидать изменения в представленности шаперонов при гиперэкспрессии токсина VapC. Действительно, было идентифицирован молекулярный шаперон DnaJ, который может эффективно восстанавливать агрегированные и неправильно свернутые белки независимо от доступности АТФ [359], потенциально заменяя шапероны со сниженным уровнем представленности DnaK и GroEL [360, 361], что также наблюдалось в условиях гиперэкспрессии VapC.

Кроме того, при стрессовых состояниях и переходе в стационарную фазу в бактериальных клетках обычно наблюдается снижение уровня метаболической активности и выработки энергии. Это представление

подтверждается полученными результатами, поскольку в ответ на стрессовое воздействие, вызванное гиперэкспрессией токсина *VarC*, наблюдается снижение представленности ферментов метаболизма углеводов. Предполагаемое уменьшение метаболической активности также может быть связано с ингибированием клеточного дыхания и сниженной интенсивностью потока электронов на дыхательной цепи. Поскольку дыхательная цепь является основным источником активных форм кислорода в клетках [362], в этих условиях снижается эндогенный окислительный стресс [363]. В соответствии с этим, на протеомном уровне было обнаружено, что белки, связанные с окислительным стрессом, такие как тиоредоксинредуктаза, которая участвует в антиоксидантной защите посредством преобразования тиоловых и дисульфидных связей [364], а также белки SufBCD, являющиеся компонентами Suf-комплекса, который отвечает за биогенез *de novo* железосерного (Fe-S) кластера [365], были менее представлены при гиперэкспрессии токсина *VarC*. Более того, Mn-супероксиддисмутаза *SodA* была заменена на медь/цинк-супероксиддисмутазу *SodC* – фермент, индуцируемый в ходе стационарной фазы и зависящий от фактора SigB. Этот фермент обеспечивает защиту от реактивных интермедиатов кислорода на поверхности микобактерий [366]. В свою очередь, каталаза *KatG* была заменена альтернативным изоферментом, возможно, являющимся аналогом *KatE* в клетках *E. coli*, активирующимся в стационарной фазе, и про который известно, что он менее эффективен, но лучше адаптирован для стрессовых условий [367, 368]. Эти две замены (*SodA* и *KatG*) могут указывать на сдвиги в системе окислительной защиты микобактерий от внутренних стрессовых факторов к внешним, аналогично окислительному стрессу, испытываемому бактериями внутри макрофагов в случае заражения их клетками *M. tuberculosis* или *M. bovis* БЦЖ [366, 369, 370].

Несмотря на то, что представленность (p)ppGpp-синтазы RelA была значительно повышена при гиперэкспрессии VarC, наблюдаемые особенности стрингент-ответа были нетипичными. Вопреки предполагаемому увеличению уровня биосинтеза аминокислот [351], фактически на протеомных профилях наблюдалось сокращение представленности синтетаз аминокислот. Тем не менее, это согласуется с общим спадом синтетических процессов в клетках во время перехода к стационарной фазе и бактериальному покою [357, 371]. Кроме того, было обнаружено, что представленность белков, участвующих в метаболизме пуриновых нуклеотидов, была снижена, что также происходит при увеличенной продукции клетками (p)ppGpp [372].

Контраргументом первоначальной гипотезе об уменьшении представленности всех синтетаз аминокислот в условиях гиперэкспрессии VarC стало обнаружение увеличения представленности глутаминсинтазы MSMEG_4290, которая катализирует превращение глутамата в глутамин, почти в 94 раза по сравнению с контролем. Физиологическое значение этого явления может быть связано с фиксацией аммония [373] или, что более вероятно, с утилизацией аминокрупп после деградации белка [374], происходящей из-за преждевременного высвобождения не полностью синтезированных полипептидных молекул из рибосомы при дефиците аминоацил-tРНК [375]. Синтезированный глутамин также может играть роль в превращении 2-кетоглутарата в глутамат – ключевом этапе пути γ -аминомасляной кислоты (также было зафиксировано повышенное содержание сукцинат-полуальдегиддегидрогеназы MSMEG_0889, которая является участником этого метаболического пути) [376]. Кроме того, повышение представленности глутаматдекарбоксилазы MSMEG_1574 предполагает потенциальную роль этого фермента в обеспечении устойчивости клеток к кислотному стрессу [377].

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 *VarC*. Эти протеомные особенности, очевидно, должны оказывать влияние на физиологию микобактериальных клеток.

3.4. TA-система *VarBC* помогает клеткам избегать отдельных стрессовых воздействий

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, возникает 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-*varC* и Δ *varBC* с контрольным штаммом дикого типа в условиях таких стрессовых воздействий, как тепловой шок, окислительный стресс, а также экспозиция с антибиотиками.

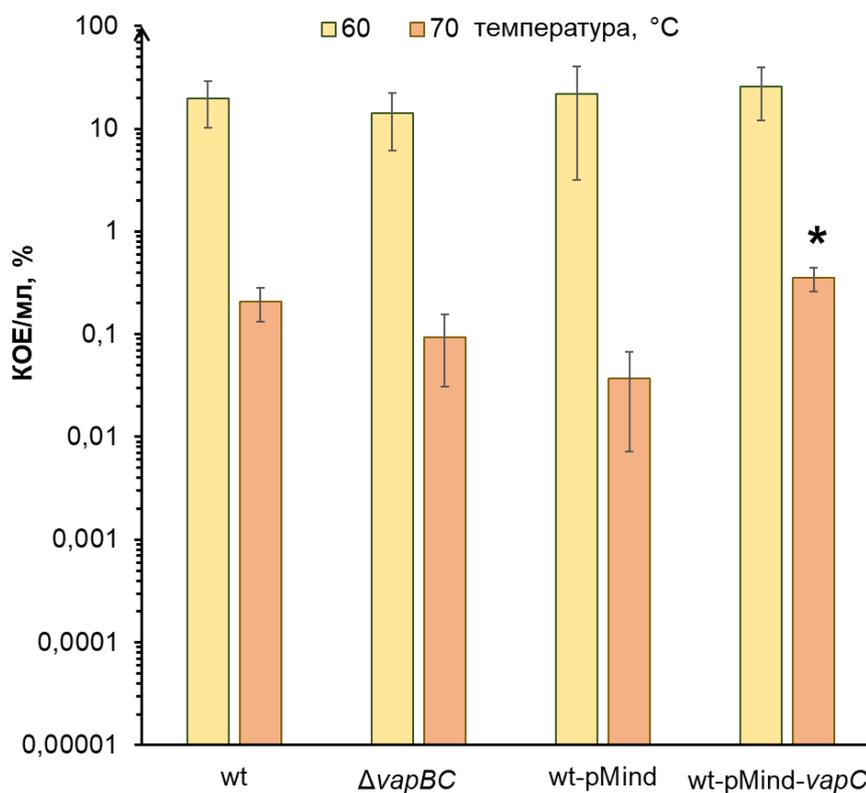
На начальном этапе данной серии экспериментов для всех штаммов *M. smegmatis* были измерены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для таких антибиотиков, как тетрациклин, ципрофлоксацин и изониазид. Проведенное измерение показало отсутствие существенных различий МИК между образцами культур целевых штаммов *M. smegmatis* (таблица 7). 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. Концентрация пероксида водорода была подобрана эмпирически таким образом, чтобы не оказывать стерилизующего эффекта при его добавке к анализируемым культурам в ходе эксперимента.

Таблица 7 – Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков, определённые для всех штаммов *M. smegmatis*, включённых в исследование выживаемости

Штамм	МИК, мкг/мл		
	тетрациклин	ципрофлоксацин	изониазид
wt	0,313	0,250	0,940
$\Delta vapBC$	0,313	0,250	0,940
$\Delta mazEF$	0,313	0,250	0,940
$\Delta vapBC\Delta mazEF$	0,313	0,250	0,940
wt-pMind	0,313	0,250	0,940
wt-pMind- <i>vapC</i>	0,313	0,250	0,940

Результаты эксперимента по определению выживаемости культур *M. smegmatis* в условиях нагревания продемонстрировали, что клетки с индукцией гиперэкспрессии токсина *VapC* в условиях теплового шока, вызванного прогреванием образцов при 70 °С в течение 10 мин, проявляют повышенную устойчивость, так как после температурного воздействия доля жизнеспособных клеток данного штамма составила 0,354 %, в то время как в контрольной культуре, несущей плазмиду pMind без вставки, в среднем сохранилось 0,0373 % клеток, давших впоследствии колонии на плотной питательной среде (рисунок 10).

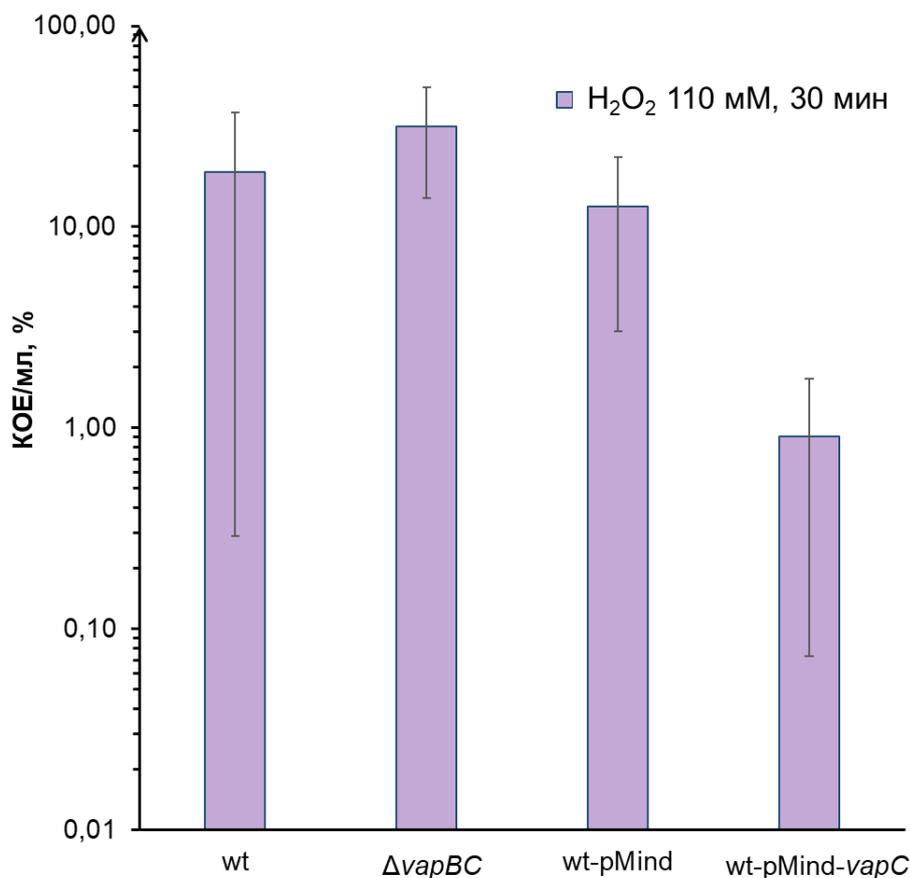


Суспензии 48-часовых культур *M. smegmatis* дикого типа (wt), $\Delta vapBC$, клеток дикого типа, трансформированных пустым вектором pMind (wt-pMind), и клеток с гиперэкспрессией токсина VapC (wt-pMind-vapC), подвергали 10-минутной тепловой обработке при 60 °C и 70 °C, после чего высевали на чашки Петри. Данные представлены в относительных единицах КОЕ/мл (%), которые рассчитывали относительно количества КОЕ/мл в культурах до стрессового воздействия. Средние значения были рассчитаны как минимум на основе трех независимых экспериментов и представлены с погрешностью стандартного отклонения. Звездочка (*) указывает на статистически значимые различия с соответствующей контрольной культурой

Рисунок 10 – Токсин VapC влияет на восприимчивость клеток *M. smegmatis* к тепловому шоку

Оценка восприимчивости клеток исследуемых штаммов *M. smegmatis* к окислительному стрессу проводилась путем расчета относительных величин КОЕ до и после кратковременного (30 мин) воздействия пероксида водорода в высокой концентрации (110 мМ). По итогам данного эксперимента наблюдалось падение относительных величин КОЕ для всех исследуемых штаммов, однако статистически значимых различий между рекомбинантными

штаммами *M. smegmatis* и соответствующими им контролями зафиксировано не было (рисунок 11).

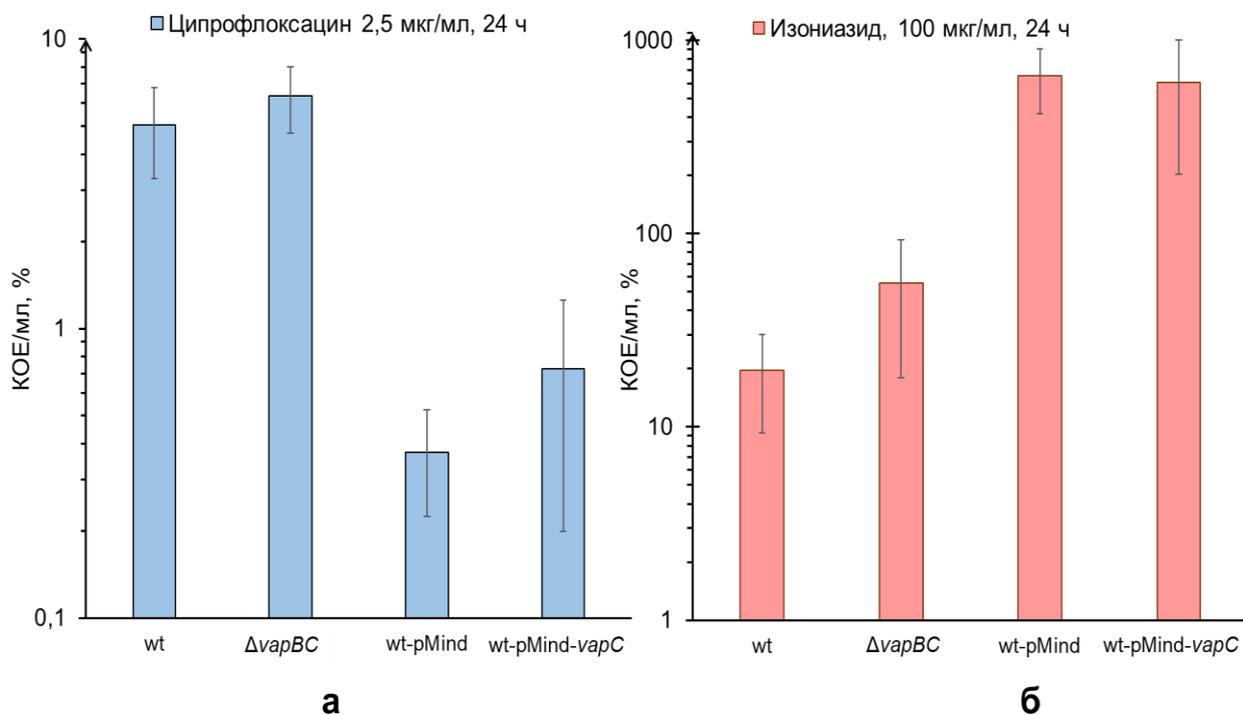


Суспензии 48-часовых культур *M. smegmatis* дикого типа (wt), $\Delta vapBC$, клеток дикого типа, трансформированных пустым вектором pMind (wt-pMind), и клеток с гиперэкспрессией токсина VapC (wt-pMind-vapC), инкубировались в присутствии пероксида водорода в концентрации 100 мМ в течение 30 мин. Данные представлены в относительных единицах КОЕ/мл (%), которые рассчитывали относительно количества КОЕ/мл в культурах до стрессового воздействия. Средние значения были рассчитаны как минимум на основе трех независимых экспериментов и представлены с погрешностью стандартного отклонения

Рисунок 11 – Выживаемость штаммов *M. smegmatis* после 30-минутного воздействия пероксида водорода (110 мМ)

Проведенные эксперименты по определению выживаемости культур *M. smegmatis* wt-pMind-vapC и $\Delta vapBC$ в условиях действия антибиотиков при сопоставлении относительных величин КОЕ анализируемых образцов с

соответствующими контролями не продемонстрировали статистически значимых различий после двадцатичетырехчасового воздействия ципрофлоксацина (2,5 мкг/мл) и изониазида (100 мкг/мл). Результаты представлены на рисунках 12а и б.

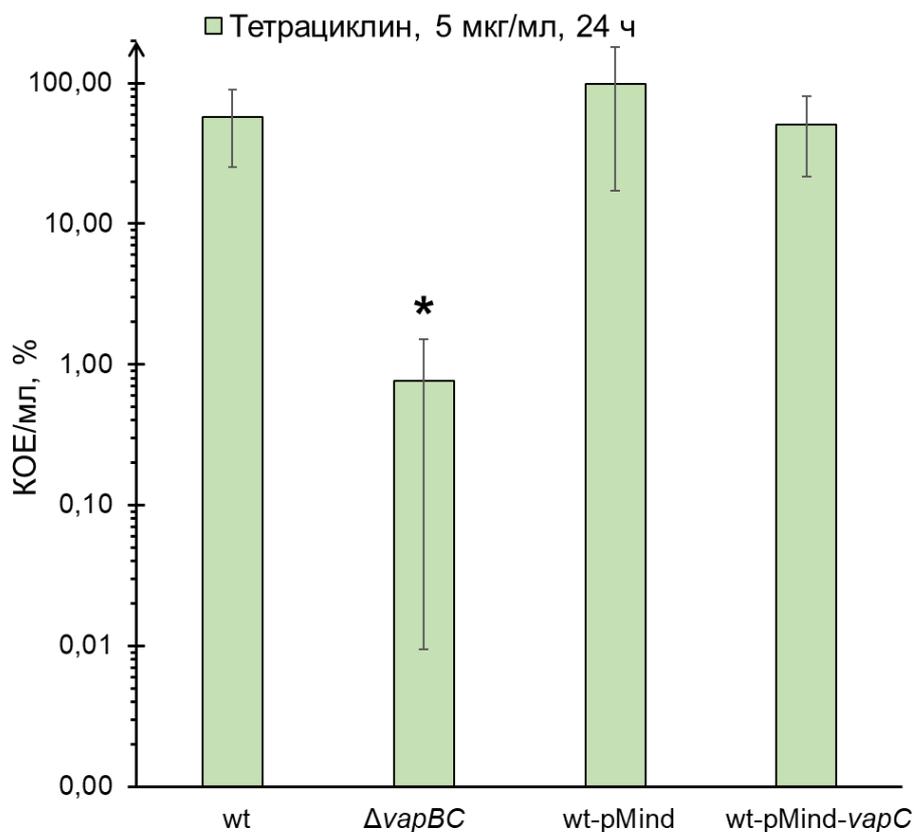


Суспензии 48-часовых культур *M. smegmatis* дикого типа (wt), $\Delta vapBC$, клеток дикого типа, трансформированных пустым вектором pMind (wt-pMind), и клеток с гиперэкспрессией токсина VapC (wt-pMind-vapC) инкубировались в присутствии (а) ципрофлоксацина в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 24 ч; (б) изониазида в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч. После экспозиции с антибиотиком бактериальные клетки отмывались фосфатно-солевым буферным раствором и высевались на чашки Петри. Данные представлены в относительных единицах КОЕ/мл (%), которые рассчитывались относительно количества КОЕ/мл в культурах до стрессового воздействия. Средние значения были рассчитаны как минимум на основе трех независимых экспериментов и представлены с погрешностью стандартного отклонения

Рисунок 12 – Токсин VapC не оказывает влияния на чувствительность клеток *M. smegmatis* к (а) ципрофлоксацину и (б) изониазиду

Однако в условиях действия тетрациклина (5 мкг/мл) через 24 ч инкубирования с данным антибиотиком для штамма $\Delta vapBC$ было

установлено существенное снижение величины КОЕ – до $0,77 \pm 0,76$ % от исходных значений (рисунок 13).



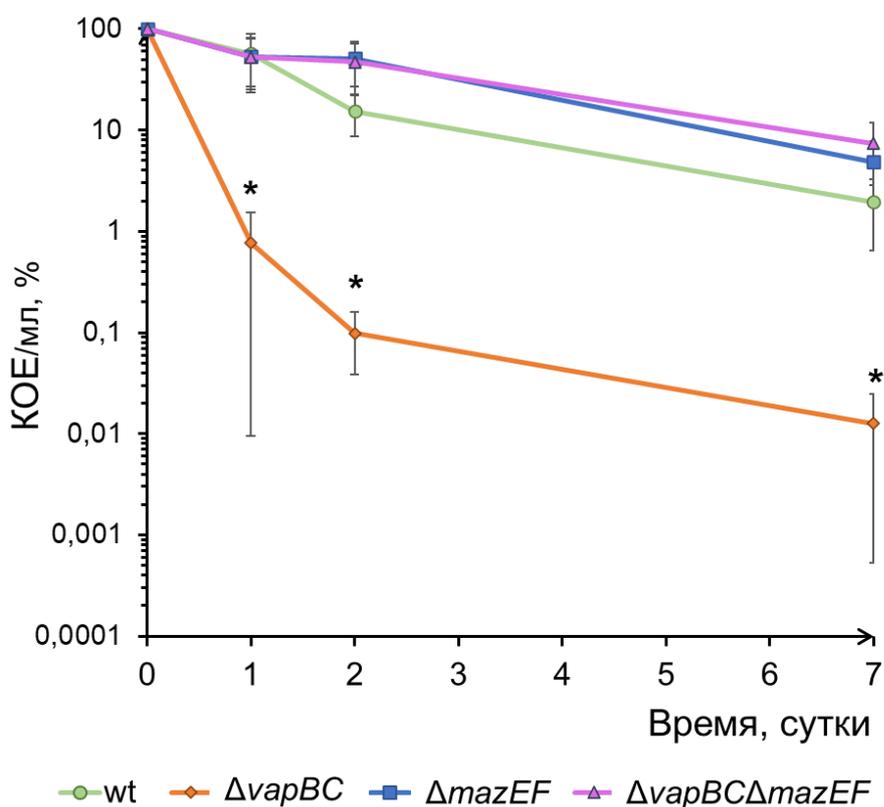
Суспензии 48-часовых культур *M. smegmatis* дикого типа (wt), $\Delta vapBC$, клеток дикого типа, трансформированных пустым вектором pMind (wt-pMind), и клеток с гиперэкспрессией токсина VapC (wt-pMind-vapC) инкубировались в присутствии тетрациклина в концентрации 5 мкг/мл в течение 24 ч. После экспозиции с антибиотиком бактериальные клетки отмывались фосфатно-солевым буферным раствором и высевались на чашки Петри. Данные представлены в относительных единицах КОЕ/мл (%), которые рассчитывались относительно количества КОЕ/мл в культурах до стрессового воздействия. Средние значения были рассчитаны как минимум на основе трех независимых экспериментов и представлены с погрешностью стандартного отклонения. Звездочка (*) указывает на статистически значимые различия с соответствующей контрольной культурой

Рисунок 13 – Токсин VapC влияет на восприимчивость клеток *M. smegmatis* к действию тетрациклина

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 14). 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 тетрациклина. Схожий уровень величин КОЕ наблюдался и в отношении штамма $\Delta mazEF$, данные представлены на рисунке 14.



Тетрациклин добавлялся в концентрации 5 мкг/мл в суспензии 48-часовых культур *M. smegmatis* дикого типа (wt), а также штаммов $\Delta vapBC$, $\Delta mazEF$ и $\Delta vapBC\Delta mazEF$, после чего осуществлялось культивирование при 37 °С и постоянном перемешивании в течение 7 суток. По окончании периода инкубирования с тетрациклином бактериальные осадки клеток отмывались в PBS. Проводились высевы на чашки Петри во временных точках 24 ч, 48 ч, а также через 7 суток. 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, полученных на основе как минимум трех независимых повторов \pm стандартное отклонение. Символом звездочки (*) отмечены статистически значимые различия с контрольной культурой дикого типа

Рисунок 14 – ТА-локусы *vapBC* и *mazEF* влияют на жизнеспособность штаммов *M. smegmatis* в условиях культивирования в питательной среде с тетрациклином

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 (таблица 8) [378].

Таблица 8 – 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

Штамм	КОЕ, %	НВЧ, %	НВЧ/КОЕ
wt	15,4 ± 6,6	22,9	1,5
<i>ΔvapBC</i>	0,1 ± 0,1	1,6 ± 0,7	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

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 ТА-систем (таблица 8). 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 (рисунок 4). 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 (рисунок 5). Судьба конкретной клетки в данном случае, по-видимому, зависит от соотношения концентраций компонентов ТА-систем. С этой точки зрения отсутствие положительного влияния гиперэкспрессии *VarC* на выживаемость при действии тетрациклина (рисунок 13) можно объяснить следующим образом. Искусственно повышенная концентрация токсина способствует замедлению роста и переходу части популяции в состояние покоя [2]. При добавлении тетрациклина эти покоящиеся клетки становятся менее чувствительными к антибиотику. В активных же клетках происходит индукция экспрессии локусов *varBC* и *mazEF*, в ходе которой синтезируемый токсин MazF частично подавляется антитоксином *VarV*. При этом часть молекул *VarV* связана с *VarC* за счет его искусственно повышенного уровня. Следовательно, в этих условиях запас белка *VarV*, способного связывать токсин MazF, ограничен, что позволяет MazF расщеплять тРНК_{Lys} и влиять на жизнеспособность клеток. Таким образом, конечный уровень КОЕ становится сопоставимым с выживаемостью культуры дикого типа, с той разницей, что штамм с гиперэкспрессией *VarC* характеризуется более высокой долей некультивируемых клеток (таблица 8) и большей активностью MazF, что приводит к сниженным уровням величин КОЕ.

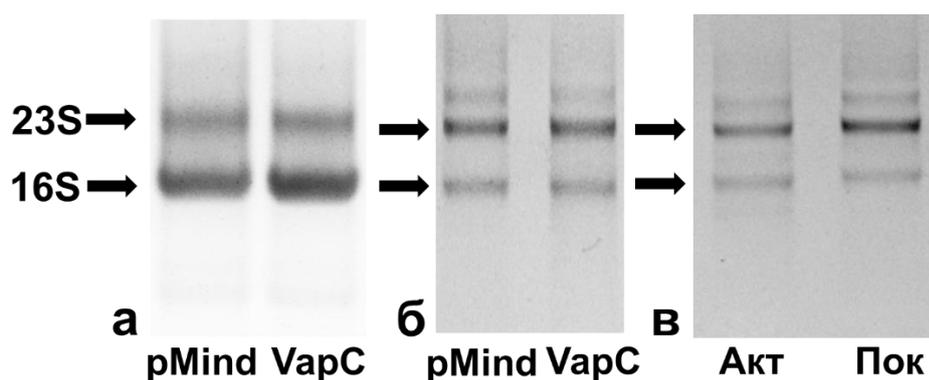
Таким образом, проведенное исследование показало, что токсин VarC принимает участие в регуляции чувствительности бактерий к высоким температурам (рисунок 10). Активация протеаз и изменения в представлении шаперонов, наблюдаемые в условиях гиперэкспрессии VarC, хорошо согласуются с повышенной термоустойчивостью. Хотя протеомные перестройки, наблюдаемые в клетках *M. smegmatis* при гиперэкспрессии токсина VarC, не дают защитных преимуществ против действия тетрациклина, роль VarC была четко выражена при делеции целого локуса *varBC*, при этом ТА-система *VarBC*, как было показано выше, не влияет на способность микобактериальных клеток адаптироваться к действию ципрофлоксацина и изониазида (рисунок 12).

Поскольку эффекты действия токсина VarC проявляются в условиях действия антибиотика, ингибирующего синтез белка, а гиперэкспрессия токсина приводит к повышению представленности рибосомальных белков в мембранной фракции и указывает на вероятную ассоциацию рибосом в инактивированном состоянии с цитоплазматической мембраной, то эффективность действия антибиотика потенциально могла бы снизиться за счет частичного исчезновения мишени и перехода клеток в состояние покоя, однако отсутствие положительного влияния гиперэкспрессии VarC на выживаемость клеток *M. smegmatis* (рисунок 13) ставит под сомнение эту гипотезу и требует дальнейшего изучения активности VarC – в частности, установления молекулярного механизма действия и определения мишени токсина.

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

3.5.1. Гиперэкспрессия токсина VarC приводит к нарушению целостности 23S рРНК *M. smegmatis* в участке сарцин-рициновой петли

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 на первом этапе был осуществлен анализ целостности молекул рРНК в отношении образцов штаммов wt-pMind-varC и wt-pMind (образцы, аналогичные взятым для протеомного анализа). Первая попытка визуализации деградации рРНК ввиду ее разрыва посредством активности VarC была осуществлена методом гель-электрофореза в агарозном геле в неденатурирующих условиях [23]. Тем не менее, на электрофореграммах между экстрактами тотальной РНК образцов штамма wt-pMind-varC и контрольного штамма wt-pMind не было обнаружено видимых различий при стандартных условиях проведения электрофореза (рисунок 15а). Анализ фракций мембранной РНК, полученных из тех же образцов, также не выявил различий в целостности при сравнении штамма с гиперэкспрессией VarC и соответствующего контроля (рисунок 15б).



(а) тотальная фракция РНК; (б) мембранная фракция РНК; (в) тотальная РНК, выделенная из активных (Акт) и покоящихся овоидных (Пок) клеток *M. smegmatis*

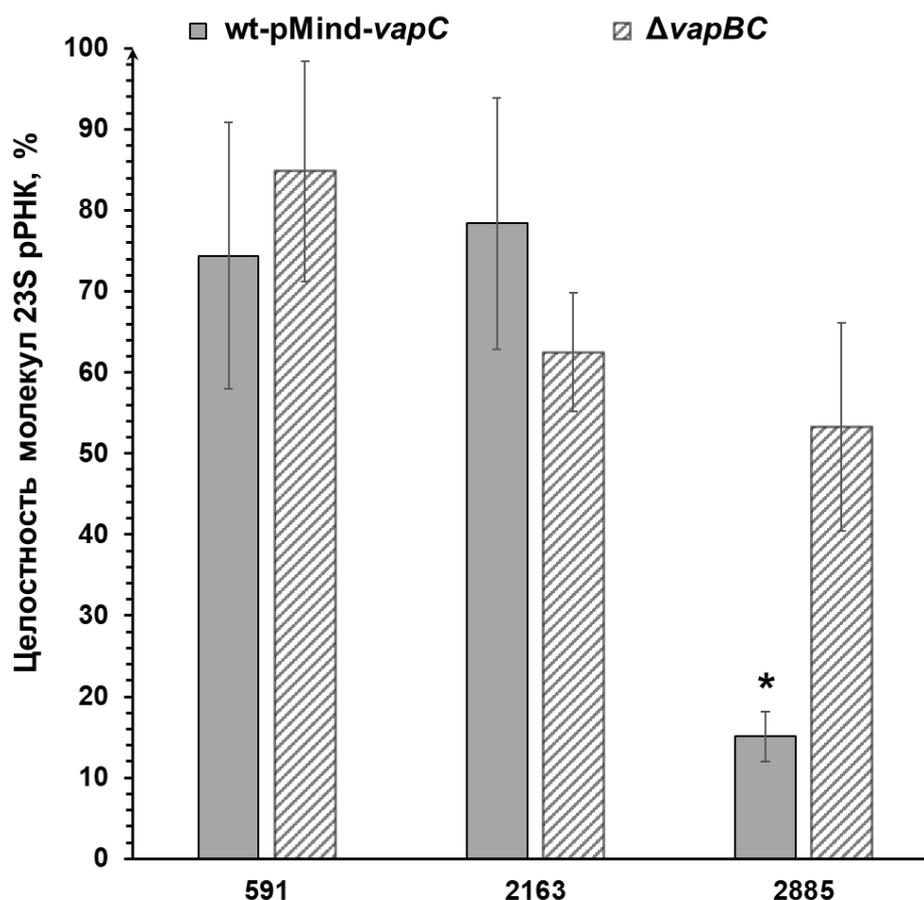
Рисунок 15 – Неденатурирующий гель-электрофорез в агарозном геле образцов РНК, выделенной из клеток *M. smegmatis* wt-pMind-*varC* (дорожки VarC) и контрольного штамма wt-pMind (дорожки pMind)

Следующим шагом в оценке целостности молекул 23S рРНК в исследуемых образцах стало проведение количественного анализа на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Дизайн праймеров для такого ПЦР-анализа был осуществлен таким образом, чтобы праймеры фланкировали сайты, содержащие гипотетические мишени токсина VarC. К таким мишеням относился участок сарцин-рициновой 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* [23, 24]); локусы, включавшие в себя сайт с парой нуклеотидов под номерами 591 (сайт расщепления 23S рРНК, идентифицированный в покоящихся формах *M. tuberculosis* [29]); а также пару нуклеотидов с номером 2163, что соответствует сайтам расщепления 23S рРНК под действием токсинов MazF3 и MazF6 в клетках *M. tuberculosis* [6]). 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 16). Нуклеотидные последовательности подобранных праймеров представлены в таблице 3 в разделе «Материалы и методы».



Рисунок 16 – 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-vapC, что свидетельствует о нарушении целостности молекул 23S рРНК именно в области сарцин-рициновой петли (рисунок 17).



Доля ампликонов 23S рРНК в образцах штамма *M. smegmatis* wt-pMind-vapC (темно-серые столбцы) и ΔvapBC (светло-серые столбцы). 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 $p \leq 0,05$

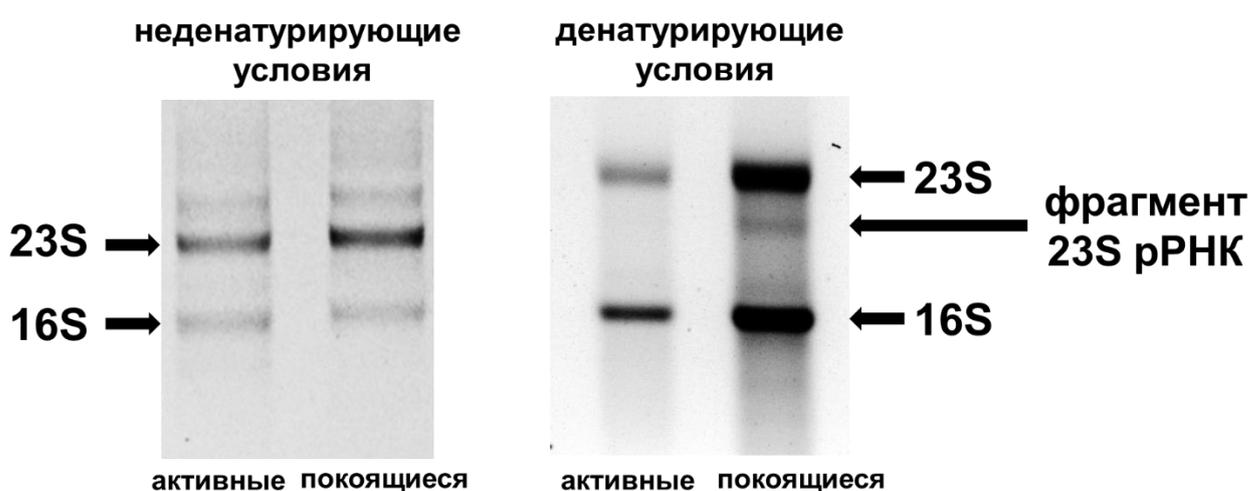
Рисунок 17 – Гиперэкспрессия токсина VarC приводит к деградации 23S рРНК в клетках *M. smegmatis* в пределах фрагмента, несущего нуклеотид с номером 2885

В то же время в образцах штамма $\Delta varBC$, в котором локус *varBC* делетирован, 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 зафиксирована повышенная деградация молекул 23S рРНК на участке между нуклеотидами с координатами 2792 и 2923.

3.5.2. Денатурирующий электрофорез в агарозном геле демонстрирует нарушение целостности 23S рРНК в покоящихся клетках *M. smegmatis*

Ранее было продемонстрировано, что при переходе клеток *M. smegmatis* в состояние покоя происходит возрастание уровня экспрессии ТА-локуса *varBC*. Так как по результатам проведённого ПЦР-анализа (рисунок 17) появились доказательства о влиянии токсина VarC на физиологические процессы в клетках *M. smegmatis* посредством разрезания 23S рРНК, предположение о VarC-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 покоеющихся клетках *M. smegmatis* были использованы цитозольные и мембранные фракции РНК, выделенные из овоидных покоеющихся клеток, сформировавшихся в ходе применения модели постепенного закисления среды [328]. В отличие от ранее проведенного неденатурирующего гель-электрофореза, разгонка в агарозном геле образцов тотальных экстрактов РНК в ходе электрофореза в денатурирующих условиях продемонстрировала фрагментацию 23S рРНК в мембранной фракции РНК овоидных покоеющихся клеток *M. smegmatis* (рисунок 18).



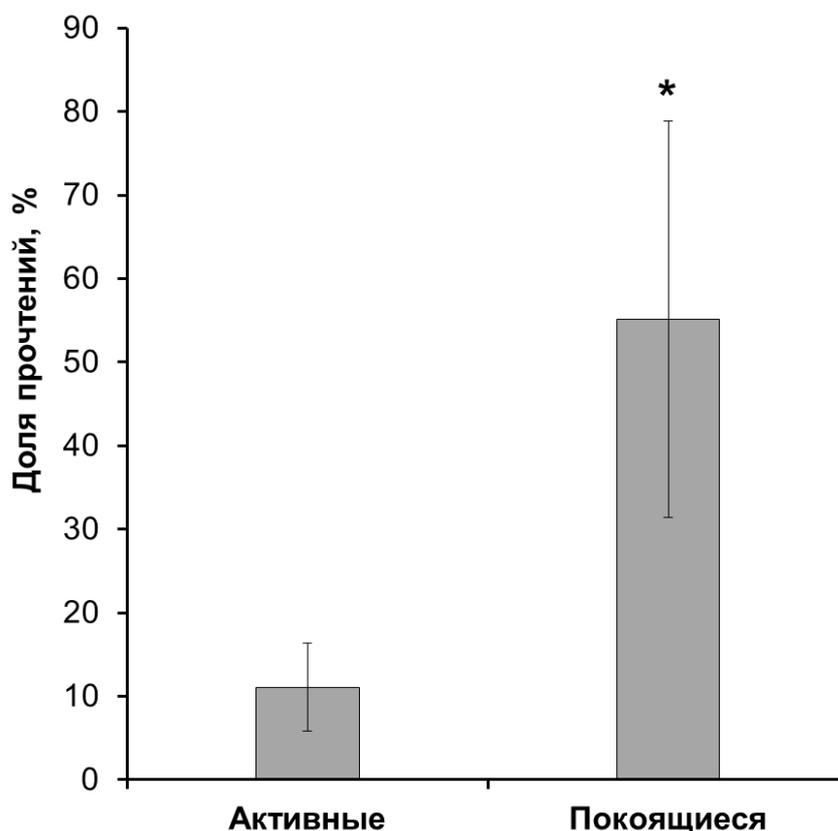
Стрелками указаны полосы, соответствующие 16S, 23S и фрагментированной 23S рРНК

Рисунок 18 – Электрофорез мембранных экстрактов РНК, выделенных из активных и покоеющихся клеток *M. smegmatis*

3.5.3. РНК-секвенирование указывает на нарушение целостности рРНК в покоеющихся клетках *M. smegmatis*

Кроме того, образцы РНК, выделенные из мембранных фракций активных и овоидных покоеющихся 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 19).



Представленность транскриптов гена, кодирующего 23S рРНК, намного выше в мембранной фракции РНК покоящихся клеток *M. smegmatis* по сравнению с активными. Представленность рассчитывалась как отношение числа прочтений гена 23S рРНК в анализе РНК-секвенирования к общему числу прочтений, данные представлены в формате среднее ± стандартное отклонение. Символ (*) указывает на статистически значимое различие (при $p \leq 0,05$) на основе непарного t-критерия Стьюдента

Рисунок 19 – Обогащение мембранной фракции покоящихся овоидных клеток *M. smegmatis* молекулами 23S рРНК

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) [379]. Так, EF-G представляет собой ГТФазу, которая проявляет свою активность на нескольких этапах биосинтеза белка. Основная функция EF-G заключается в катализе процесса движения молекул тРНК в ходе элонгации трансляции, но также этот фактор задействован на последнем этапе трансляции, способствуя рециркуляции рибосом. В частности, для преобразования энергии гидролиза ГТФ в движение фактору элонгации G требуется наличие лигандов в А-сайте рибосомы, таких как тРНК на этапе транслокации или фактора рециркуляции рибосом в процессе разборки посттерминационного комплекса [380].

В совокупности эти факты указывают на критическую роль целостности сарцин-рициновой петли в обеспечении работы трансляционного аппарата. Расщепление 23S рРНК токсином VarC препятствовало бы эффективному взаимодействию фактора EF-G (и в некоторой степени EF-Tu) с сарцин-рициновой петлей и сделало бы невозможным её скручивание в более сложные пространственные структуры. Более того, выраженное снижение эффективности взаимодействия EF-G с рибосомальной РНК будет препятствовать рециркуляции рибосом. Если эта гипотеза верна, то рибосомы не смогут как транслоцировать тРНК во время элонгации синтезируемой полипептидной цепи, так и терминировать трансляцию и принимать участие в новом акте синтеза белка, что сделает их нефункциональными.

Кроме того, продемонстрированное выше обогащение мембранной фракции РНК в покоящихся клетках *M. smegmatis* молекулами рРНК (рисунок

19) указывает на ассоциацию рибосом с цитоплазматической мембраной. 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 заякоривании 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 мембранной фракции протеомных профилей образцов штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией *VarC*. Ранее опубликованный протеомный профиль, полученный для покоящихся клеток *M. smegmatis* [381], также показал корреляцию с профилем гиперэкспрессирующего *VarC* штамма. Авторы обнаружили факторы транскрипции, ДНК-полимеразу, 2 субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы, несколько транскрипционных регуляторов, семь рибосомальных белков, факторы элонгации трансляции Tu и Ts, а также триггер-фактор Tig именно в мембранной фракции покоящихся клеток *M. smegmatis*. Это совпадение подкрепило идею о схожих физиологических характеристиках между покоящимися и гиперэкспрессирующими *VarC* клетками *M. smegmatis* и подтвердило гипотезу об участии токсина *VarC* в развитии состояния покоя *M. smegmatis* посредством инактивации аппарата синтеза белка.

Хотя данные о доле покрытия прочтениями РНК-секвенирования для обнаруженного сайта расщепления 23S рРНК относительно всего гена, кодирующего 23S рРНК, продемонстрировали отсутствие разницы в количестве расщепленной рРНК между мембранными фракциями активных и

покоящихся клеток *M. smegmatis*, это наблюдение не противоречит предложенному механизму инактивации рибосом. Конечно, в клетках должен быть фоновый уровень активности VarC. Отсюда следует, что деградация рРНК, вызванная токсином VarC, должна обнаруживаться при любых физиологических условиях. Таким образом, вновь появившиеся инактивированные рибосомы могли ассоциироваться с цитоплазматической мембраной, тем самым устанавливая некоторое соотношение с неповрежденными мембранно-ассоциированными рибосомами, участвующими в котрансляционной транслокации. При этом при гиперэкспрессии VarC или в стрессовых условиях содержание инактивированных рибосом в клетке будет расти, а количество связанных с мембраной рибосом будет увеличиваться пропорционально, поскольку связанных с мембраной неповрежденных рибосом, вероятно, станет больше из-за общего ингибирования синтеза белка. В результате мы наблюдаем большую загрузку мембраны рибосомами в покоящихся бактериальных клетках при практически неизменной доле расщепленных рибосом.

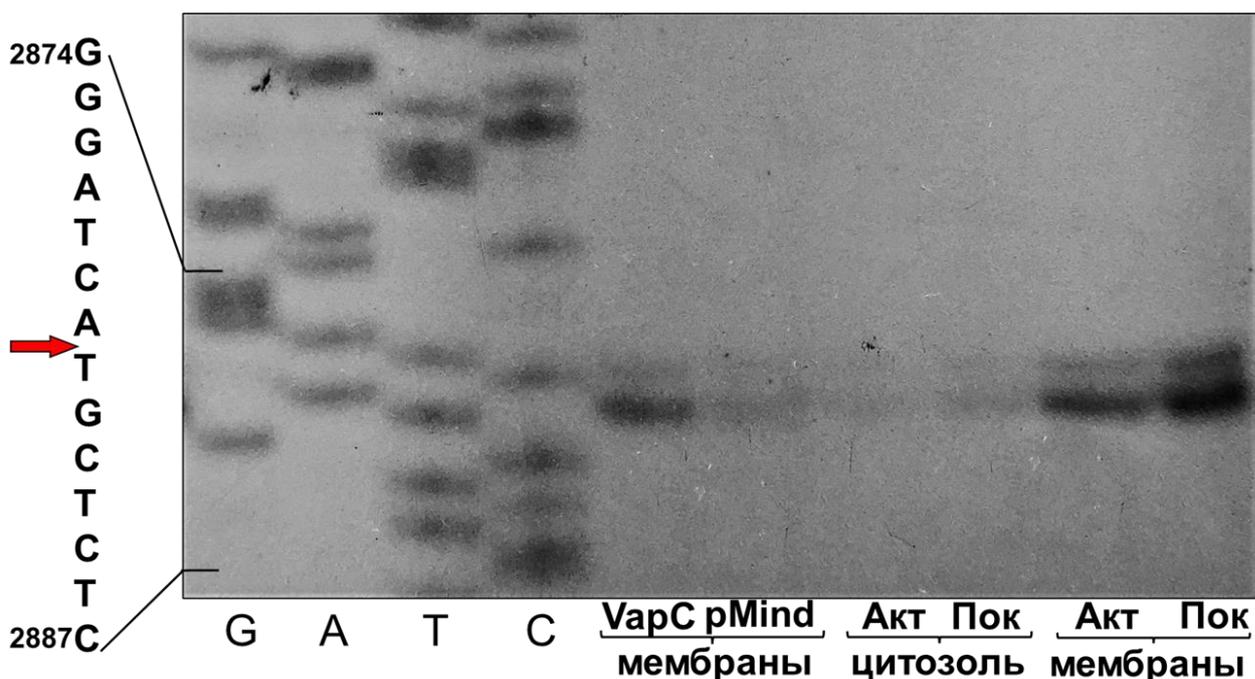
В целом, инактивация и консервация рибосом являются хорошо известными и довольно хорошо изученными явлениями. У кишечных бактерий это было описано в стрессовых условиях и в ходе формирования персистеров и происходит посредством димеризации рибосом (образование 100S рибосом) из-за участия специальных белков RaiA, rmf и HPF [382, 383]. Это состояние обратимо, поэтому инактивированные рибосомы могут быть реактивированы белком HflX, который преобразует рибосомы 100S обратно в состояние 70S, что позволяет клеткам активировать синтез белка и возобновить рост [384].

Хотя рибосомы 100S точно не известны для микобактерий, эти микроорганизмы способны генерировать гибернирующие рибосомы

посредством связывания их с фактором, способствующим гибернации HPF [385, 386]. Взаимодействие стабилизирует рибосомы и делает их невосприимчивыми к антибиотикам, ингибирующим синтез белка, что позволяет микобактериям выживать в стационарной фазе, состоянии покоя и неблагоприятных условиях в организме хозяина [387].

3.5.4. Разрыв в 23S рРНК расположен между U2880 и A2881

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-*varC*, остановка реакции удлинения была зафиксирована в рамках фрагмента последовательности 23S рРНК ²⁸⁶⁹CCUGUCCCUAGU|ACGAGAGGACC₂₈₉₁ между нуклеотидами U2880 и A2881 (рисунок 20, 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 20, 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*.



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-*varC* 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

Рисунок 20 – Определение сайта разрезания молекул 23S рРНК в области сарцин-рициновой петли в ходе анализа методом удлинения праймера

Идентифицированный в данной работе участок расщепления сарцин-рициновой петли расположен в 5 нуклеотидах (рисунок 21) от сайтов разрезания 23S рРНК (между нуклеотидами с координатами G2885 и A2886), выявленных соответственно для токсинов VarC20 и VarC26 у *M. tuberculosis* [23, 24].

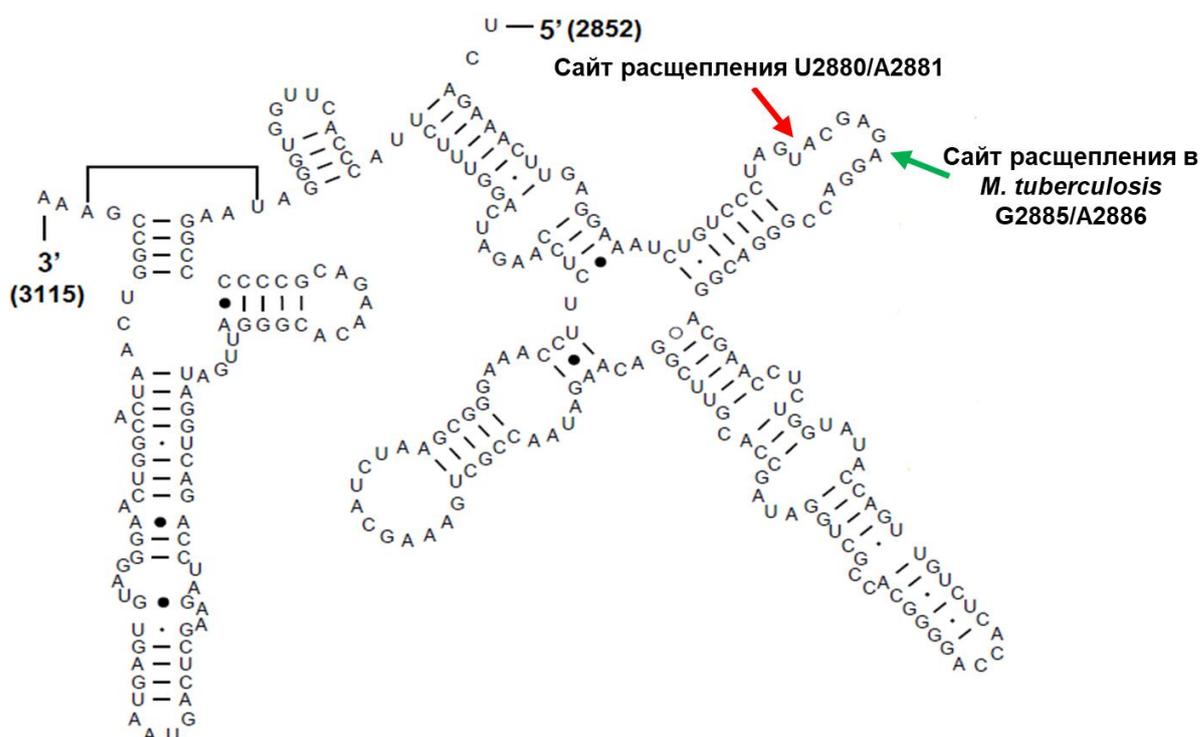


Рисунок 21 – Вторичная структура домена VI 23S рРНК. Сайт расщепления токсином VarC в сарцин-рициновой петле указан красной стрелкой, а сайт разрезания, выявленный для токсина VarC20 у *M. tuberculosis*, отмечен зеленой стрелкой. Данная структура относится к ранее опубликованным [24] и взята с сайта 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.

Таким образом, предлагаемый способ стабилизации и инактивации рибосом посредством деградации 23S рРНК может быть довольно распространенным механизмом для микобактерий, поскольку сайт-специфическое расщепление молекул 23S рРНК было идентифицировано

также в покоящихся клетках *M. tuberculosis* [29]. Хотя обнаруженный участок разрыва не совпал с известными сайтами разрезания рРНК гомологами *VapC*, высокое содержание мРНК-транскриптов *vapBC* в покоящихся клетках возбудителя туберкулёза [29] указывает на то, что расщепление может быть вызвано именно данным токсином. Наличие пятидесяти ТА-модулей семейства *VapBC* у *M. tuberculosis* также указывает на высокую вероятность вариабельности их мишеней.

3.6. Гиперэкспрессия токсина *VapC* *M. smegmatis* в клетках *M. tuberculosis* также приводит к снижению скорости роста культур

Для проверки гипотезы об универсальности механизмов действия токсинов, относящихся к семейству ТА-систем *VapBC*, в условиях гетерологичной экспрессии белка-токсина микобактерий была осуществлена трансформация клеток *M. tuberculosis* плазмидой *pMind* со вставкой гена *vapC*, 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-pMind-vapC*), а также контрольных культур дикого типа, несущих плазмиду *pMind* без вставки целевого гена (*МТВ-pMind*). Различия в скорости роста между контрольным и опытным штаммами проявились уже после десяти суток культивирования (рисунок 22).

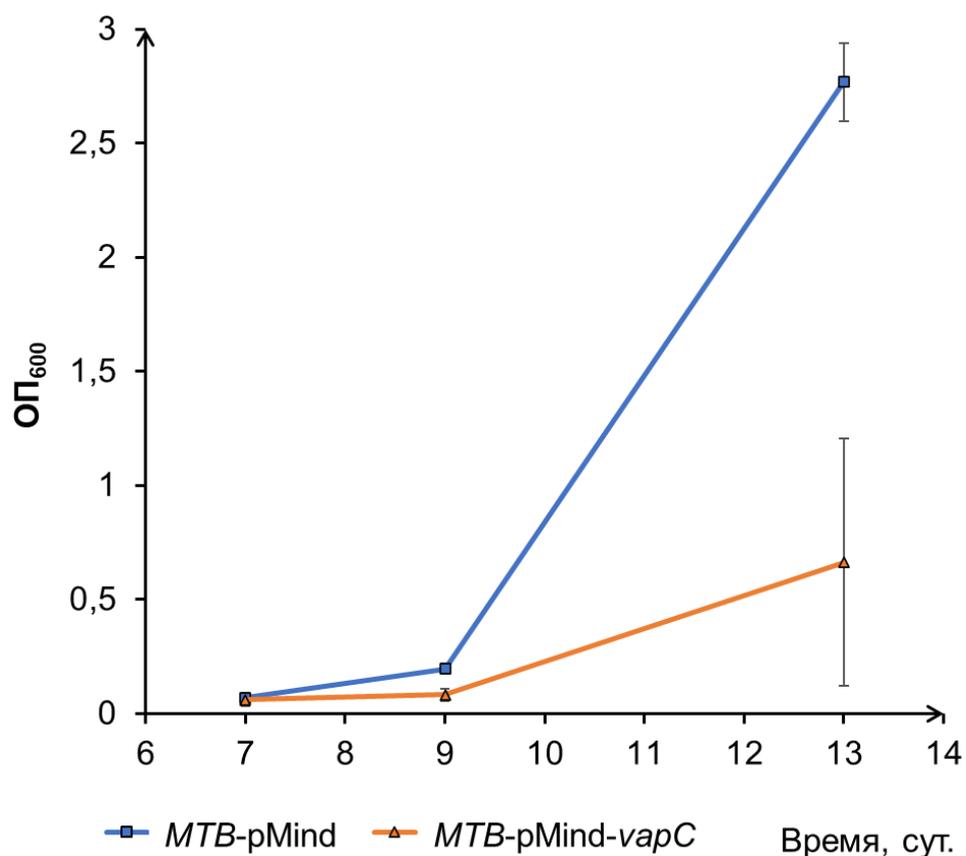


Рисунок 22 – Гиперэкспрессия токсина *VapC* *M. smegmatis* приводит к замедлению роста культуры *M. tuberculosis*

Так, на тринадцатые сутки культивирования оптическая плотность суспензий штамма *MTB-pMind-vapC* была ниже, чем в контроле в среднем в 4,18 раз. Полученный результат свидетельствует о том, что гетерологичная экспрессия токсина *VapC* 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* и, по-видимому, демонстрирует сходство процессов перехода в состояние покоя и формирования персистирующих форм у этих двух видов микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам проведения исследования было установлено, что фенотипическая устойчивость *M. smegmatis* к антибиотикам, подавляющим трансляцию, связана с взаимодействием компонентов токсин-антитоксиновых систем VarBC и MazEF и обусловлена VarC-зависимым расщеплением 23S рРНК, приводящим к инактивации рибосом, ассоциации их с цитоплазматической мембраной и активации в клетках общего стрессового ответа и что можно приблизительно описать следующей схемой (рисунок 23).

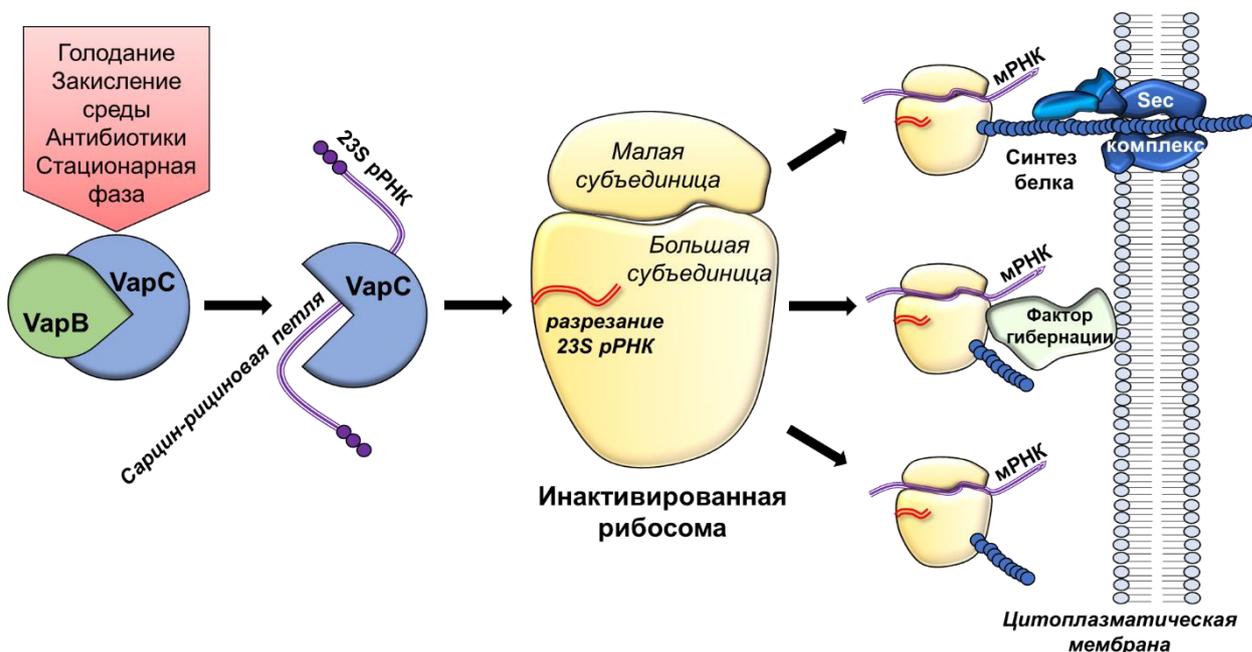


Рисунок 23 – Гипотетический механизм образования мембранно-ассоциированных инактивированных рибосом под действием токсина VarC в клетках *M. smegmatis*

Различные эндогенные, а также факторы окружающей среды, такие как переход в стационарную фазу, действие антибиотиков, голодание клеток, кислотный стресс и другие, могут вызывать протеолиз молекул антитоксина VarB и активировать токсин VarC. Токсин VarC расщепляет 23S рРНК в области сарцин-рициновой петли, что, приводит к инактивации некоторой доли клеточных рибосом. Несмотря на то, что рибосомы остаются в собранном

состоянии, они становятся неспособны активно участвовать в процессе трансляции, что приводит к значительным перестройкам протеомного профиля и способствует развитию перехода микобактериальных клеток в состояния покоя. Часть этих расщепленных рибосом сохраняется в покоящихся клетках посредством ассоциации с цитоплазматической мембраной при участии Sec-комплекса или специализированных факторов заякоривания рибосом, наподобие белка YqjD, обнаруженного в клетках *E. coli*. Задействование данных систем представляет собой частный случай консервации аппарата синтеза белка, который реализуется как в покоящихся, так и в гиперэкспрессирующих VarC культурах и помогает предотвратить избыточный распад рибосом. В этом состоянии «гибернации» рибосомы могут сохраняться до наступления более благоприятных условий, после чего они диссоциируют из комплекса с мембраной; расщепление 23S рРНК, вызванное токсином VarC, может быть залечено специальной РНК-лигазой (аналогично тому, как RtcB повторно лигирует 16S рРНК после расщепления, вызванного токсином MazF в *E. coli*), и синтез белка восстанавливается [388].

Предложенный механизм хорошо согласуется с наблюдением за вытеснением расщепленных молекул 23S рРНК интактными в ходе реактивации возбудителя туберкулёза из состояния покоя [389]. Он также является выгодным для бактериальной клетки в процессе перехода обратно к активному росту, поскольку синтез рибосом *de novo* в данном случае не представляет необходимости, а для восстановления функциональности рибосом достаточно осуществить репарацию разрыва рРНК. Кроме того, расщепление 23S рРНК, вызванное VarC, может быть успешно встроено в процессы образования гибернирующих рибосом посредством их взаимодействия с белком HPF [385] и токсин-зависимым перепрограммированием протеома [139]. Целый комплекс механизмов может

быть последовательно задействован с целью обеспечения бактериям способности выживать в стрессовых условиях и регулировать клеточную физиологию для борьбы с неблагоприятными условиями окружающей среды и защитными системами организма-хозяина.

В заключение следует отметить, за годы исследований физиологических ролей ТА-бактериальных систем создано некоторое понимание молекулярных механизмов развития бактериального стрессового ответа, индукции перехода клеток в состояние персистенции и процессов образования биоплёнок. Таким образом, ТА-системы контролируют механизмы, которые в значительной степени способствуют неблагоприятному исходу в лечении бактериальных инфекций антибиотиками. По мере расширения нашего понимания механизмов формирования персистеров появляется все больше возможностей для разработки новых способов борьбы с ними. Как правило, персистеры растут медленно или находятся в состоянии покоя, то есть они функционально изолированы от остальной популяции. В связи с этим, необходимо минимизировать гетерогенность популяции, например, затрудняя переход клеток в состояние покоя или персистенции, и, тем самым, получая более однородную популяцию бактерий, восприимчивую к антибиотикам, что может быть достигнуто, например, путем управления активностью компонентов ТА-систем с помощью антисмысловых РНК. Направленное изменение соотношения токсинов и антитоксинов может позволить не только предотвращать образование персистирующих клеток, но и индуцировать процессы программируемой клеточной гибели бактерий, как, например, в случае ТА-системы *mazEF*, а сами принципы активности токсинов могут стать основой для создания новых антибактериальных препаратов. Например, изучение токсина CcdB, нарушающего функции ДНК-гиразы, что приводит к фрагментации ДНК и гибели клеток *E. coli*, уже позволило синтезировать

пептид, ингибирующий этот фермент (и другие топоизомеразы), что приводит к гибели бактерий [390]. В системе ω - ϵ - ζ ТА токсин ζ продемонстрировал способность фосфорилировать предшественника пептидогликана уридин-N-ацетилглюкозамин, что также привело к конкурентному ингибированию белка MurA, играющего важную роль в биосинтезе пептидогликана. Ферментативный продукт токсина ζ , уридин-N-ацетилглюкозамин-3-фосфат, был описан как потенциальная основа для разработки нового класса антибиотиков широкого спектра действия [149].

ВЫВОДЫ

Таким образом, на основании заключения были сделаны следующие 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 аминоацил-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 сарцин-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balaban N., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D., Brynildsen M., Bumann D., Camilli A., Collins J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J., Hardt W., Harms A., Heinemann M., Hung D., Jenal U., Levin B., Michiels J., Storz G., Tan M., Tenson T., Van Melderen L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence//*Nat. Rev. Microbiol.* – 2019. – V. 17. N. 7. – P. 441–8.
2. Demidenok O.I. Kaprelyants A.S., Goncharenko A.V. Toxin-antitoxin *vapBC* locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis*//*FEMS Microbiol. Lett.* – 2014. – V. 352. N. 1. – P. 69–77.
3. Sala A., Bordes P., Genevaux P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*//*Toxins (Basel)*. – 2014. – V. 6. N. 3. – P. 1002–20.
4. Winther K.S., Gerdes K. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. N. 18. – P. 7403–7.
5. Christensen S., Gerdes K. RelE toxins from bacteria and archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA//*Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 48. – P. 1389–400.
6. Schifano J., Edifor R., Sharp J., Ouyang M., Konkimalla A., Husson R., Woychik N. Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. N. 21. – P. 8501–6.
7. Guo M., Feng H., Zhang J., Wang W., Wang Y., Li Y., Gao C., Chen H., Feng Y., He Z.G. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system//*Genome Res.* – 2009. – V.19. – P. 1301–8.
8. Maisonneuve E., Shakespeare L., Jørgensen M., Gerdes K. Bacterial persistence by RNA endonucleases//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. – P. 13206–11.
9. Yamaguchi Y., Park J.H., Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea//*Annu. Rev. Genet.* – 2011. – V. 45. – P. 61–79.
10. Pandey D., Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes//*Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – P. 966–76.
11. Ramisetty B., Santhosh R. Endoribonuclease type II toxin-antitoxin systems: functional or selfish?//*Microbiology (Reading)*. – 2017. – V. 163. N. 7. – P. 931–9.

12. Mukherjee A., Wheaton G., Counts J., Ijeomah B., Desai J., Kelly R. VapC toxins drive cellular dormancy under uranium stress for the extreme thermoacidophile *Metallosphaera prunae*//Environ. Microbiol. – 2017. – V. 19. N. 7. – P. 2831–42.
13. Lipuma J., Cinege G., Bodogai M., Oláh B., Kiers A., Endre G., Dupont L., Dusha I. A *vapBC*-type toxin-antitoxin module of *Sinorhizobium meliloti* influences symbiotic efficiency and nodule senescence of *Medicago sativa*//Environ. Microbiol. – 2014. – V. 16. – P. 3714–29.
14. Helaine S., Cheverton A.M., Watson K.G., Faure L.M., Matthews S.A., Holden D.W. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters//Science. – 2014. – V. 343. – P.204–8.
15. Keren I., Minami S., Rubin E., Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters//mBio. – 2011. – V. 2 – P. e00100–11.
16. Albrethsen J., Agner J., Piersma S.R., Hojrup P., Pham T., Weldingh K., Jimenez C., Andersen P., Rosenkrands I. Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems//Mol. Cell Proteomics. – 2013. – V. 12. – P. 1180–91.
17. Cruz J.W., Woychik N.A. tRNAs taking charge//Pathog. Dis. –2016. – V. 74. – P. ftv117.
18. Goeders N., Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems//Toxins (Basel). – 2014. – V. 6. – P. 304–24.
19. Arcus V., McKenzie J., Robson J., Cook G. The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array//Protein Eng. Des. Sel. – 2011. – V. 24. N. 1-2. – P. 33–40.
20. Lopes A.P., Lopes L.M., Fraga T.R., Chura-Chambi R.M., Sanson A.L., Cheng E., Nakajima E., Morganti L., Martins E.A. VapC from the leptospiral VapBC toxin-antitoxin module displays ribonuclease activity on the initiator tRNA//PLoS One. – 2014. – V. 9. N. 7. – P. e101678.
21. Walling L.R., Butler J.S. Homologous VapC Toxins Inhibit Translation and Cell Growth by Sequence-Specific Cleavage of tRNA^{fMet}//J. Bacteriol. – 2018. – V. 200. N. 3. – P. e00582–17.
22. Cruz J.W., Sharp J.D., Hoffer E.D., Maehigashi T., Vvedenskaya I.O., Konkimalla A., Husson R.N., Nickels B.E., Dunham C.M., Woychik N.A. Growth-regulating *Mycobacterium tuberculosis* VapC-mt4 toxin is an isoacceptor-specific tRNase//Nat. Commun. – 2015. – V. 6. – P. 7480.

23. Winther K., Tree J.J., Tollervey D., Gerdes K. VapCs of *Mycobacterium tuberculosis* cleave RNAs essential for translation//Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. N. 20. – P. 9860–71.
24. Winther K.S., Brodersen D.E., Brown A.K., Gerdes K. VapC20 of *Mycobacterium tuberculosis* cleaves the Sarcin-Ricin loop of 23S rRNA//Nat. Commun. – 2013. – V. 4. – P. 2796.
25. Nariya H., Inouye M. MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development//Cell. – 2008. – V. 132. N 1. – P. 55–66.
26. Amitai S., Yassin Y., Engelberg-Kulka H. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: a point of no return//J. Bacteriol. – 2004. – V. 186. – P. 8295–300.
27. Erental A., Sharon I., Engelberg-Kulka H. Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: the mazEF-mediated death pathway inhibits an apoptotic-like death//PLoS Biol. – 2012. – V. 10. N 3. – P. e1001281.
28. Sharp J., Cruz J., Raman S., Inouye M., Husson R., Woychik N. Growth and translation inhibition through sequence-specific RNA binding by *Mycobacterium tuberculosis* VapC toxin//J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287. N 16. – P. 12835–47.
29. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA//BMC Genomics. – 2015. – V. 16. – P. 954.
30. Bajaj R.A., Arbing M.A., Shin A., Cascio D., Miallau L. Crystal structure of the toxin Msmeg_6760, the structural homolog of *Mycobacterium tuberculosis* Rv2035, a novel type II toxin involved in the hypoxic response//Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun. – 2016. – V.1. N. 72. – P. 863–9.
31. McKenzie J.L., Robson J., Berney M., Smith T.C., Ruthe A., Gardner P.P., Arcus V.L., Cook G.M. A VapBC toxin-antitoxin module is a posttranscriptional regulator of metabolic flux in mycobacteria//J. Bacteriol. – 2012. – V. 194. N 9. – P. 2189-204.
32. Katz M., Strugnell R., Rood J. Molecular characterization of a genomic region associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*//Infect. Immun. – 1992. – V. 60. N 11. – P. 4586–92.
33. Ogura T., Hiraga S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – V. 80. – P. 4784–8.
34. Gerdes K., Rasmussen P., Molin S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – V. 83. – P. 3116–20.

35. Yarmolinsky M. Programmed cell death in bacterial populations//Science. – 1995. – V. 267. – P. 836–7.
36. Karoui H., Bex F., Dreze P., Couturier M. Ham22, a mini-F mutation which is lethal to host cell and promotes *recA*-dependent induction of lambdoid prophage//EMBO J. – 1983. – V. 2. – P. 1863–8.
37. Jaffe A., Ogura T., Hiraga S. Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth//J. Bacteriol. – 1985. – V. 163. – P. 841–9.
38. Hiraga S., Jaffe A., Ogura T., Mori H., Takahashi H. F plasmid *ccd* mechanism in *Escherichia coli*//J. Bacteriol. – 1986. – V. 166. – P. 100–4.
39. Tam J. E., Kline B. C. The F plasmid *ccd* autorepressor is a complex of CcdA and CcdB proteins//Mol. Gen. Genet. – 1989. – V. 219. – P. 26–32.
40. Gerdes K., Bech F., Jørgensen S., Løbner-Olesen A., Rasmussen P., Atlung T., Boe L., Karlstrom O., Molin S., von Meyenburg K. Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli* *relB* operon//EMBO J. – 1986. – V. 5. – P. 2023–9.
41. Gerdes K., Helin K., Christensen O.W., Lobner-Olesen A. Translational control and differential RNA decay are key elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the *parB* locus of plasmid R1//J. Mol. Biol. – 1988. – V. 203. – P. 119–29.
42. Van Melderen L., Bernard P., Couturier M. Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria//Mol. Microbiol. – 1994. – V. 11. – P. 1151–7.
43. Tsuchimoto S., Nishimura Y., Ohtsubo, E. The stable maintenance system *pem* of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth//J. Bacteriol. – 1992. – V. 174. – P. 4205–11.
44. Masuda Y., Miyakawa K., Nishimura Y., Ohtsubo, E. *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100//J. Bacteriol. – 1993. – V. 175. – P. 6850–6.
45. Christensen S. K., Pedersen K., Hansen F. G., Gerdes K. Toxin-antitoxin loci as stress-response elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA//J. Mol. Biol. – 2003. – V. 332. – P. 809–19.

46. Wilbaux M., Mine N., Guerout A., Mazel D., Van Melderen L. Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the *ccd* family in *Escherichia coli* O157:H7//J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – P. 2712–9.
47. Leplae R., Geeraerts D., Hallez R., Guglielmini J., Drèze P., Van Melderen L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families//Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39. – P. 5513–25.
48. Ramisetty B., Santhosh R. Horizontal gene transfer of chromosomal Type II toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*//FEMS Microbiol. Lett. – 2016. – V. 363. – P. fnv238.
49. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin, E.V. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes//Biol. Direct. – 2009. – V. 4. – P. 19.
50. Hayes F., Van Melderen, L. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function//Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2011. – V. 46. – P. 386–408.
51. Fiedoruk K., Daniluk T., Swiecicka I., Sciepek M., Leszczynska K. Type II toxin-antitoxin systems are unevenly distributed among *Escherichia coli* phylogroups//Microbiology (Reading) – 2015. – V. 161. – P. 158–67.
52. Fineran P.C., Blower T.R., Foulds I.J., Humphreys D.P., Lilley K.S., Salmond G.P. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair//Proc. Natl Acad. Sci. USA – 2009. – V. 106. – P. 894–9.
53. Wang X., Lord D., Cheng H., Osbourne D., Hong S., Sanchez-Torres V., Quiroga C., Zheng K., Herrmann T., Peti W., Benedik M., Page R., Wood T. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS//Nat. Chem. Biol. – 2012. – V. 8. – P. 855–61.
54. Aakre C., Phung T., Huang D., Laub M. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β -sliding clamp//Mol. Cell – 2013. – V. 52. – P. 617–28.
55. Freire D., Gutierrez C., Garza-Garcia A., Grabowska A., Sala A., Ariyachaokun K., Panikova T., Beckham K., Colom A., Pogenberg V., Cianci M., Tuukkanen A., Boudehen Y., Peixoto A., Botella L., Svergun D., Schnappinger D., Schneider T., Genevaux P., de Carvalho L., Wilmanns M., Parret A., Neyrolles O. An NAD⁺ phosphorylase toxin triggers *Mycobacterium tuberculosis* cell death//Mol. Cell. – 2019. – V. 73. – P. 1282–91.

56. Cai Y., Usher B., Gutierrez C., Tolcan A., Mansour M., Fineran P.C., Condon C., Neyrolles O., Genevaux P., Blower T.R. A nucleotidyltransferase toxin inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* through inactivation of tRNA acceptor stems//Sci. Adv. – 2020. – V. 6. – P. eabb6651.
57. Jimmy S., Saha C., Kurata T., Stavropoulos C., Oliveira S., Koh A., Cepauskas A., Takada H., Rejman D., Tenson T., Strahl H., Garcia-Pino A., Hauryliuk V., Atkinson G. A widespread toxin-antitoxin system exploiting growth control via alarmone signaling//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2020. – V. 117. – P. 10500–10.
58. Songailiene I., Juozapaitis J., Tamulaitiene G., Ruksenaite A., Šulčius S., Sasnauskas G., Venclovas Č., Siksnys V. HEPN-MNT toxin-antitoxin system: the HEPN ribonuclease is neutralized by oligoAMPylation//Mol. Cell. – 2020. – V. 80. – P. 955–70.
59. Kurata T., Brodiazhenko T., Alves Oliveira S.R., Roghanian M., Sakaguchi Y., Turnbull K.J., Bulvas O., Takada H., Tamman H., Ainelo A., Pohl R., Rejman D., Tenson T., Suzuki T., Garcia-Pino A., Atkinson G.C., Hauryliuk V. RelA-SpoT homolog toxins pyrophosphorylate the CCA end of tRNA to inhibit protein synthesis//Mol. Cell. – 2021. – V. 81. – P. 3160–70.
60. Li M., Gong L., Cheng F., Yu H., Zhao D., Wang R., Wang T., Zhang S., Zhou J., Shmakov S.A., Koonin E.V., Xiang H. Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems//Science. – 2021. – V. 372. – P. eabe5601.
61. Hargreaves D., Santos-Sierra S., Giraldo R., Sabariego-Jareño R., de la Cueva-Méndez G., Boelens R., Díaz-Orejas R., Rafferty J.B. Structural and functional analysis of the Kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1//Structure. – 2002. – V. 10. – P. 1425–33.
62. Sterckx Y., Jové T., Shkumatov A., Garcia-Pino A., Geerts L., De Kerpel M., Lah J., De Greve H., Van Melderen L., Loris R. A unique hetero-hexadecameric architecture displayed by the *Escherichia coli* O157 PaaA2-ParE2 antitoxin-toxin complex//J. Mol. Biol. – 2016. – V. 428. – P. 1589–1603.
63. Castro-Roa D., Garcia-Pino A., De Gieter S., van Nuland N.A.J., Loris R., Zenkin N. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu//Nat. Chem. Biol. – 2013. – V. 9. – P. 811–7.
64. Harms A., Stanger F.V., Scheu P.D., de Jong I.G., Goepfert A., Glatter T., Gerdes K., Schirmer T., Dehio C. Adenylation of gyrase and Topo IV by FicT toxins disrupts bacterial DNA topology//Cell Rep. – 2015. – V. 12. – P. 1497–07.

65. Dalton, K., Crosson, S. A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex//*Biochemistry*. – 2010. – V. 49. – P. 2205–15.
66. Kumar P., Issac B., Dodson E. J., Turkenburg J.P., Mande S. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* YefM antitoxin reveals that it is not an intrinsically unstructured protein//*J. Mol. Biol.* – 2008. – V. 383. – P. 482–93.
67. Brown B., Lord D., Grigoriu S., Peti W., Page, R. The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the mqsRA operon promoter//*J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – P. 1286–94.
68. Zhang D., de Souza R.F., Anantharaman V., Iyer L.M., Aravind, L. Polymorphic toxin systems: comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics//*Biol. Direct.* – 2012. – V. 7. – P. 18.
69. Harms A., Liesch M., Körner J., Québatte M., Engel P., Dehio C. A bacterial toxin-antitoxin module is the origin of inter-bacterial and inter-kingdom effectors of *Bartonella*//*PLoS Genet.* – 2017. – V. 13. – P. e1007077.
70. Brantl S. Bacterial chromosome-encoded small regulatory RNAs//*Future Microbiol.* – 2009. – V. 4. – P. 85–103.
71. Brantl, S. Acting antisense: plasmid- and chromosome-encoded sRNAs from Gram-positive bacteria//*Future Microbiol.* – 2012. – V. 7. – P. 853–71.
72. Kawano M., Aravind L., Storz G. An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin//*Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 64. – P. 738–54.
73. Guo Y., Quiroga C., Chen Q., McAnulty M.J., Benedik M.J., Wood T.K., Wang X. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*//*Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – P. 6448–62.
74. Ono T., Akimoto S., Ono K., Ohnishi Y. Plasmid genes increase membrane permeability in *Escherichia coli*//*Biochim. Biophys. Acta* – 1986. – V. 867. – P. 81–8.
75. Weaver K., Weaver D., Wells C., Waters C., Gardner M., Ehli E. *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded Fst toxin affects membrane permeability and alters cellular responses to lantibiotics//*J. Bacteriol.* – 2003. – V. 185. – P. 2169–77.
76. Fozo E.M., Hemm M.R., Storz G. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them//*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2008. – V. 72. – P. 579–89.
77. Unoson C., Wagner E.G. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*//*Mol. Microbiol.* – 2008. – V. 70. – P. 258–70.

78. Weel-Sneve R., Kristiansen K.I., Odsbu I., Dalhus B., Booth J., Rognes T., Skarstad K., Bjørås M. Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities//PLoS Genet. – 2013. – V. 9 – P. e1003260.
79. Brantl S., Jahn N. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems, FEMS Microbiol. Rev. – 2015. – V. 39. – P. 413–27.
80. Thisted T., Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by the *hok/sok* system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates *hok* gene expression indirectly through the overlapping *mok* gene//J. Mol. Biol. – 1992. – V. 223. – P. 41–54.
81. Gerdes K., Wagner E. RNA antitoxins//Curr. Opin. Microbiol. – 2007. – V. 10. – P. 117–24.
82. Darfeuille F., Unoson C., Vogel J., Wagner E. An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes//Mol. Cell. – 2007. – V. – P. 381–92.
83. Wen J., Won D., Fozo E.M. The ZorO-OrzO type I toxin-antitoxin locus: repression by the OrzO antitoxin//Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42. – P. 1930–46.
84. Greenfield T., Franch T., Gerdes K., Weaver K. Antisense RNA regulation of the par post-segregational killing system: structural analysis and mechanism of binding of the antisense RNA, RNAII and its target, RNAI//Mol. Microb. – 2001. – V. 42. – P. 527–37.
85. Durand S., Jahn N., Condon C., Brantl S. Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*//RNA Biol. – 2012. – V.9. – P. 1491–97.
86. Jahn N., Brantl S. One antitoxin–two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation//Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – P. 9870–80.
87. Jurenas D., Fraikin N., Goormaghtigh F., Van Melderen L. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems//Nat. Rev. Microbiol. – 2022. – V. 20. N. 6. – P. 335–50.
88. Zhang S., Wang Q., Quan S., Yu X., Wang Y., Guo D., Peng L., Feng H., He Y. Type II Toxin–Antitoxin System in Bacteria: Activation, Function, and Mode of Action//Biophys. Rep. – 2020. – V. 6. – P. 68–79.
89. Jiang Y., Pogliano J., Helinski D., Konieczny I., ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase//Mol. Microbiol. – 2002. – V. 44. – P. 971–9.
90. Pedersen K., Zavialov A., Pavlov M., Elf J., Gerdes K., Ehrenberg M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site//Cell. – 2003. – V. 112. – P. 131–40.

91. Zhang Y., Zhang J., Hoeflich K.P., Ikura M., Qing G., Inouye M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*//Mol. Cell. – 2003. – V. 12. – P. 913–23.
92. Mets T., Lippus M., Schryer D., Liiv A., Kasari V., Paier A., Maiväli Ü, Remme J, Tenson T, Kaldalu N. Toxins MazF and MqsR cleave *Escherichia coli* rRNA precursors at multiple sites//RNA Biol. – 2017. – V. 14. – P. 124–35.
93. Schifano J.M., Cruz J.W., Vvedenskaya I.O., Edifor R., Ouyang M., Husson R.N., Nickels B.E., Woychik N.A. tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin//Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – P. 1256–70.
94. Dao-Thi M., Van Melderen L., De Genst E., Afif H., Buts L., Wyns L., Loris R. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB//J. Mol. Biol. – 2005. – V. 348. – P. 1091–102.
95. Turnbull K.J., Gerdes K. HicA toxin of *Escherichia coli* derepresses *hicAB* transcription to selectively produce HicB antitoxin//Mol. Microbiol. – 2017. – V. 104. – P. 781–92.
96. Dienemann C., Boggild A., Winther K, Gerdes K., Brodersen D. Crystal structure of the VapBC toxin-antitoxin complex from *Shigella flexneri* reveals a hetero-octameric DNA-binding assembly//J. Mol. Biol. – 2011. – V. 414. – P. 713–22.
97. Sharma A., Singh N., Bhasin M., Tiwari P., Chopra P., Varadarajan R., Singh R. Deciphering the role of VapBC13 and VapBC26 toxin antitoxin systems in the pathophysiology of *Mycobacterium tuberculosis*//Commun. Biol. – 2024. – V. – P. 1417.
98. Kaspy I., Rotem E., Weiss N., Ronin I., Balaban N.Q., Glaser G. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase//Nat. Commun. – 2013. – V. 4. – P. 3001.
99. Vang Nielsen S., Turnbull K.J., Roghanian M., Bærentsen R., Semanjski M., Brodersen D.E., Macek B., Gerdes K. Serine-threonine kinases encoded by split *hipA* homologs inhibit tryptophanyl-tRNA synthetase//mBio. – 2019. – V. 10. – P. e01138-19.
100. Lu C., Nakayasu E.S., Zhang L.Q., Luo Z.Q. Identification of Fic-1 as an enzyme that inhibits bacterial DNA replication by AMPylating GyrB, promoting filament formation//Sci. Signal. – 2016. – V. 9. N. 412. – P. ra11.

101. Jurenas D., Chatterjee S., Konijnenberg A., Sobott F., Droogmans L., Garcia-Pino A., Van Melderen L. AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA(fMet)//*Nat. Chem. Biol.* – 2017. – V. 13. – P. 640–6.
102. Yashiro Y., Sakaguchi Y., Suzuki T., Tomita K. Mechanism of aminoacyl-tRNA acetylation by an aminoacyl-tRNA acetyltransferase AtaT from enterohemorrhagic *E. coli*//*Nat. Commun.* – 2020. – V. 11. – P. 5438.
103. Cheverton A.M., Gollan B., Przydacz M., Wong C.T., Mylona A., Hare S.A., Helaine S., A *Salmonella* toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA//*Mol. Cell.* – 2016. – V. 63. – P. 86–96.
104. Meinhart A., Alonso J.C., Strater N., Saenger W. Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 1661–6.
105. Andrews E., Arcus V. The mycobacterial PhoH2 proteins are type II toxin antitoxins coupled to RNA helicase domains//*Tuberculosis.* – 2015. – V. 95. – P. 385–94.
106. Rocker A., Meinhart A. A cis-acting antitoxin domain within the chromosomal toxin-antitoxin module EzeT of *Escherichia coli* quenches toxin activity//*Mol. Microbiol.* – 2015. – V. 97. – P. 589–604.
107. Boggild A., Sofos N., Andersen K.R., Feddersen A., Easter A.D., Passmore L.A., Brodersen D. The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity//*Structure.* – 2012. – V. 20. – P. 1641–1648.
108. Schureck M.A., Maehigashi T., Miles S.J., Marquez J., Cho S.E., Erdman R., Dunham C.M. Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)₂-HigB toxin-antitoxin complex//*J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 289. – P.1060–70.
109. Kamada K., Hanaoka F., Burley S.K. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition//*Mol. Cell.* – 2003. – V. 11. – P. 875–84.
110. Li G.Y., Zhang Y., Inouye M., Ikura M. Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site//*J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 14628–36.
111. Khoo S.K., Loll B., Chan W.T., Shoeman R.L., Ngoo L., Yeo C.C., Meinhart A. Molecular and structural characterization of the PezAT chromosomal toxin-antitoxin system of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*//*J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 19606–18.

112. Schumacher M.A., Piro K.M., Xu W., Hansen S., Lewis K., Brennan R.G. Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB//*Science*. – 2009. – V. 323. – P. 396–401.
113. Brown B., Grigoriu S., Kim Y., Arruda J., Davenport A., Wood T., Peti W., Page R. Three-dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties//*PLoS Pathog*. – 2009. – V. 5. – P. e1000706.
114. Samson J.E., Spinelli S., Cambillau C., Moineau S. Structure and activity of AbiQ, a lactococcal endoribonuclease belonging to the type III toxin-antitoxin system//*Mol. Microbiol*. – 2013. – V. 87. – P. 756–68.
115. Blower T.R., Pei X.Y., Short F.L., Fineran P.C., Humphreys D.P., Luisi B.F., Salmond G.P. A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system//*Nat. Struct. Mol. Biol*. – 2011. – V. 18. – P. 185–90.
116. Short F., Pei X., Blower T., Ong S., Fineran P., Luisi B., Salmond G. Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – V. 110. – P. E241–9.
117. Brierley I., Pennell S., Gilbert R.J. Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication//*Nat. Rev. Microbiol*. – 2007. – V. 5. – P. 598–610.
118. Peselis A., Serganov A. Structure and function of pseudoknots involved in gene expression control//*Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. – 2014. – V. 5. N. 6. – P. 803–22.
119. Masuda H., Tan Q., Awano N., Wu K.P., Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*//*Mol. Microbiol*. – 2012. – V. 84. – P. 979–89.
120. Cheng H., Soo V., Islam S., McAnulty M., Benedik M., Wood T. Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress//*Environ. Microbiol*. – 2014. – V. 16. – P. 1741–54.
121. Johnson A., O'Donnell M. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork//*Annu. Rev. Biochem*. – 2005. – V. 74. – P. 283–315.
122. Maki S., Kornberg A. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. II. A novel complex including the gamma subunit essential for processive synthesis//*J. Biol. Chem*. – 1988. – V. 263. – P. 6555–60.

123. Yu X., Gao X., Zhu K., Yin H., Mao X., Wojdyla J., Qin B., Huang H., Wang M., Sun Y., Cui S. Characterization of a toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism//Commun. Biol. – 2020. – V. 3. – P. 216.
124. Garcia-Contreras R., Zhang X.S., Kim Y., Wood T.K. Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes//PLoS One. – 2008. – V. 3. – P. e2394.
125. Marimon O., Teixeira J., Cordeiro T., Soo V., Wood T., Mayzel M., Amata I., García J., Morera A., Gay M., Vilaseca M., Orekhov V.Y., Wood T.K., Pons M. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system//Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – P. 13634.
126. Yao J., Guo Y., Zeng Z., Liu X., Shi F., Wang X. Identification and characterization of a HEPN-MNT family type II toxin-antitoxin in *Shewanella oneidensis*//Microb. Biotechnol. – 2015. – V. 8. – P. 961–73.
127. Jia X., Yao J., Gao Z., Liu G., Dong Y.H., Wang X., Zhang H. Structure-function analyses reveal the molecular architecture and neutralization mechanism of a bacterial HEPN-MNT toxin-antitoxin system//J. Biol. Chem. – 2018. – V. 293. – P. 6812–6823.
128. Yao J., Zhen X., Tang K., Liu T., Xu X., Chen Z., Guo Y., Liu X., Wood T.K., Ouyang S., Wang X. Novel polyadenylation-dependent neutralization mechanism of the HEPN/MNT toxin/antitoxin system//Nucleic Acids Res. – 2020. – V. 48. – P. 11054–67.
129. Choi J.S., Kim W., Suk S., Park H., Bak G., Yoon J., Lee Y. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*//RNA Biol. – 2018. – V. 15. – P. 1319–35.
130. Critchlow S., O'Dea M., Howells A., Couturier M., Gellert M., Maxwell A. The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription//J. Mol. Biol. – 1997. – V. 273. – P. 826–39.
131. Bernard P., Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA topoisomerase II complexes//J. Mol. Biol. – 1992. – V. 226. – P. 735–45.
132. Hallez R., Geeraerts D., Sterckx Y., Mine N., Loris R., Van Melderen L. New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7//Mol. Microbiol. – 2010. – V. 76. – P. 719–32.
133. Ames J.R., Muthuramalingam M., Murphy T., Najjar F.Z., Bourne C.R. Expression of different ParE toxins results in conserved phenotypes with distinguishable classes of toxicity//Microbiology open. – 2019. – V. 8. – P. e902.

134. Roberts R., Strom A., Helinski D. The parDE operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss//J. Mol. Biol. – 1994. – V. 237. – P. 35–51.
135. Jankevicius G., Ariza A., Ahel M., Ahel I. The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA//Mol. Cell. – 2016. – V. 64. – P. 1109–16.
136. Jurenas D., Van Melderen L. The variety in the common theme of translation inhibition by type II toxin-antitoxin systems//Front. Genet. – 2020. – V. 11. – P. 262.
137. Culviner P.H., Laub M.T. Global analysis of the *E. coli* toxin MazF reveals widespread cleavage of mRNA and the inhibition of rRNA maturation and ribosome biogenesis//Mol. Cell. – 2018. – V. 70. – P. 868–80.e10.
138. Mets T., Kasvandik S., Saarma M., Maiväli Ü., Tenson T., Kaldalu N. Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR//Biochimie. – 2019. – V. 156. – P. 79–91.
139. Barth V., Woychik N. The sole *Mycobacterium smegmatis* MazF toxin targets tRNA_{Lys} to impart highly selective, codon-dependent proteome reprogramming//Front. Genet. – 2019. – V. 10. – P. 1356.
140. Cintrón M., Zeng J.M., Barth V.C., Cruz J.W., Husson R.N., Woychik N.A. Accurate target identification for *Mycobacterium tuberculosis* endoribonuclease toxins requires expression in their native host//Sci. Rep. – 2019. – V. 9. – P. 5949.
141. Goeders N., Dreze P.L., Van Melderen L. Relaxed cleavage specificity within the RelE toxin family//J. Bacteriol. – 2013. – V. 195. – P. 2541–9.
142. Schureck M., Repack A., Miles S., Marquez J., Dunham C. Mechanism of endonuclease cleavage by the HigB toxin//Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – P. 7944–53.
143. Jorgensen M.G., Pandey D.P., Jaskolska M., Gerdes K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea//J. Bacteriol. – 2009. – V. 191. – P. 1191–9.
144. Rycroft J., Gollan B., Grabe G., Hall A., Cheverton A., Larrouy-Maumus G., Hare S., Helaine S. Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persister formation during macrophage infection//Nat. Commun. – 2018. – V. 9. – P. 1993.
145. Wilcox B., Osterman I., Serebryakova M., Lukyanov D., Komarova E., Gollan B., Morozova N., Wolf Y., Makarova K., Helaine S., Sergiev P., Dubiley S., Borukhov S., Severinov K. *Escherichia coli* ItaT is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyltRNA^{Ile}//Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46. – P. 7873–85.

146. Fozo E.M., Kawano M., Fontaine F., Kaya Y., Mendieta K.S., Jones K.L., Ocampo A., Rudd K.E., Storz G. Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs//Mol. Microbiol. – 2008. – V. 70. – P. 1076–93.
147. Kawano M., Oshima T., Kasai H., Mori H. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-aminoacid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*//Mol. Microbiol. – 2002. – V. 45. – P. 333–49.
148. Patel S., Weaver K.E. Addiction toxin Fst has unique effects on chromosome segregation and cell division in *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*//J. Bacteriol. – 2006. – V. 188. – P. 5374–84.
149. Mutschler H., Gebhardt M., Shoeman R.L., Meinhart A. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis//PLoS Biol. – 2011. – V. 9. – P. e1001033.
150. Rucker A., Peschke M., Kittilä T., Sakson R., Brieke C., Meinhart A. The ng_ζ1 toxin of the gonococcal epsilon/zeta toxin/antitoxin system drains precursors for cell wall synthesis//Nat. Commun. – 2018. – V. 9. – P. 1686.
151. Tan Q., Awano N., Inouye M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB//Mol. Microbiol. – 2011. – V. 79. – P. 109–18.
152. Engelberg-Kulka H., Amitai S., Kolodkin-Gal I., Hazan R. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria//PLoS Genet. – 2006. – V. 2. – P. e135.
153. Engelberg-Kulka H., Hazan R., Amitai, S. mazEF: a chromosomal toxin- antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria//J. Cell Sci. – 2005. – V. 118. – P. 4327–32.
154. Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters//Cell. – 2014. – V. 157. – P. 539–48.
155. Wang X., Kim Y., Hong S.H., Ma Q., Brown B.L., Pu M., Tarone A.M., Benedik M.J., Peti W., Page R., Wood T.K. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response//Nat. Chem. Biol. – 2011. – V. 7. – P. 359–66.
156. Kolodkin-Gal I., Hazan R., Gaathon A., Carmeli S., Engelberg-Kulka H. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF*-mediated cell death in *Escherichia coli*//Science. – 2007. – V. 318. – P. 652–5.

157. Belitsky M., Avshalom H., Erental A., Yelin I., Kumar S., London N., Sperber M., Schueler-Furman O., Engelberg-Kulka H. The *Escherichia coli* extracellular death factor EDF induces the endoribonucleolytic activities of the toxins MazF and ChpBK//Mol. Cell. – 2012. – V. 41. – P. 625–35.
158. Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser, G. An *Escherichia coli* chromosomal ‘addiction module’ regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93. – P. 6059–63.
159. Vesper O., Amitai S., Belitsky M., Byrgazov K., Kaberdina A., Engelberg-Kulka H., Moll I. Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*//Cell. – 2011. – V. 147. – P. 147–57.
160. Pedersen K., Christensen S.K., Gerdes K. Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins//Mol. Microbiol. – 2002. – V. 45. – P. 501–10.
161. Tsilibaris V., Maenhaut-Michel G., Mine N., Van Melderen L. What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome?//J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – P. 6101–8.
162. Ramisetty B., Raj S., Ghosh D. *Escherichia coli* MazEF toxin-antitoxin system does not mediate programmed cell death//J. Basic. Microbiol. – 2016. – V. 56. – P. 1398–402.
163. Kaldalu N., Maiväli Ü., Hauryliuk V., Tenson T. Reanalysis of proteomics results fails to detect MazF-mediated stress proteins//mBio. – 2019. – V. 10. – P. e00949-19.
164. Christensen S., Mikkelsen M., Pedersen K., Gerdes K. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress//Proc. Natl Acad. Sci. USA – 2001. – V. 98. – P. 14328–33.
165. González Barrios A., Zuo R., Hashimoto Y., Yang L., Bentley W., Wood T. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022)//J. Bacteriol. – 2006. – V. 188. – P. 305–16.
166. Kwan B.W., Lord D.M., Peti W., Page R., Benedik M.J., Wood T.K. The MqsR/MqsA toxin/antitoxin system protects *Escherichia coli* during bile acid stress//Environ. Microbiol. – 2015. – V. 17. – P. 3168–81.
167. Soo V.W.C., Wood T.K. Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD//Sci. Rep. – 2013. – V. 3. – P. 3186.

168. Dorr T., Vulić M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*//PLoS Biol. – 2010. – V. 8. – P. e1000317.
169. Verstraeten N., Knapen W., Kint C., Liebens V., Van den Bergh B., Dewachter L., Michiels J., Fu Q., David C., Fierro A., Marchal K., Beirlant J., Versées W., Hofkens J., Jansen M., Fauvart M., Michiels J. Obg and membrane depolarization are part of a microbial Bet-Hedging strategy that leads to antibiotic tolerance//Mol. Cell. – 2015. – V. 59. – P. 9–21.
170. Berghoff B., Hoekzema M., Aulbach L., Wagner E. Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation//Mol. Microbiol. – 2017. – V. 103. – P. 1020–33.
171. Ramisetty B.C.M., Ghosh D., Roy Chowdhury M., Santhosh R.S. What is the link between stringent response, endoribonuclease encoding type II toxin-antitoxin systems and persistence?//Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 1882.
172. Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. Retraction notice to: (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity//Cell. – 2018. – V. 172. – P. 1135.
173. Maisonneuve E., Shakespeare L., Jørgensen M., Gerdes K. Retraction for Maisonneuve. et al. Bacterial persistence by RNA endonucleases//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2018. – V. 115. – P. E2901.
174. Harms A., Fino C., Sørensen M.A., Semsey S., Gerdes K. Prophages and growth dynamics confound experimental results with antibiotic-tolerant persister cells//mBio. – 2017. – V. 8. – P. e01964–17.
175. Goormaghtigh F., Fraikin N., Putrinš M., Hallaert T., Hauryliuk V., Garcia-Pino A., Sjödin A., Kasvandik S., Udekwu K., Tenson T., Kaldalu N., Van Melderen L. Reassessing the role of type II Toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells//mBio. – 2018. – V. 9. – P. e00640-18.
176. Pontes M., Groisman E. Slow growth determines nonheritable antibiotic resistance in *Salmonella enterica*//Sci. Signal. – 2019. – V. 12. – P. eaax3938.
177. Rosendahl S., Tamman H., Brauer A., Remm M., Hörak R. Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial//Sci. Rep. – 2020. – V. 10. – P. 9230.
178. LeRoux M., Culviner P., Liu Y., Littlehale M., Laub M. Stress can induce transcription of toxin-antitoxin systems without activating toxin//Mol. Cell. – 2020. – V. 79. – P. 280–92.e8.

179. Christensen S., Maenhaut-Michel G., Mine N., Gottesman S., Gerdes K., Van Melderen L. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM- yoeB toxin-antitoxin system//Mol. Microbiol. – 2004. – V. 51. – P. 1705–17.
180. Volzing K.G., Brynildsen M. P. Stationary-phase persisters to ofloxacin sustain DNA damage and require repair systems only during recovery//mBio. – 2015. – V. 6. – P. e00731-15.
181. Goormaghtigh F., Van Melderen L. Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures//Sci. Adv. – 2019. – V. 5. – P. eaav9462.
182. Korch S.B., Henderson T.A., Hill T.M. Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis//Mol. Microbiol. – 2003. – V. 50. – P. 1199–213.
183. Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shores N., Balaban N.Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance//Science. – 2017. – V. 355. – P. 826–30.
184. Santi I., Manfredi P., Maffei E., Egli A., Jenal U. Evolution of antibiotic tolerance shapes resistance development in chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections//mBio. – 2021. – V. 12. – P. e03482-20.
185. Rotem E., Loinger A., Ronin I., Levin-Reisman I., Gabay C., Shores N., Biham O., Balaban N.Q. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – P. 12541–6.
186. Saavedra De Bast M., Mine N., Van Melderen L. Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as anti-addiction modules//J. Bacteriol. – 2008. – V. 190. – P. 4603–9.
187. Santos-Sierra S., Giraldo R., Díaz-Orejas R. Functional interactions between homologous conditional killer systems of plasmid and chromosomal origin//FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – V. 152. – P. 51–6.
188. Santos-Sierra S., Giraldo R., Díaz Orejas R. Functional interactions between chpB and parD, two homologous conditional killer systems found in the *Escherichia coli* chromosome and in plasmid R1//FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 168. – P. 51–8.
189. Garvey P., Fitzgerald G.F., Hill C. Cloning and DNA sequence analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40//Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61. – P. 4321–8.

190. Pecota D.C., Wood T.K. Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1//J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 2044–50.
191. Otsuka Y., Yonesaki T. A novel endoribonuclease, RNase LS, in *Escherichia coli*//Genetics. – 2005. – V. 169. – P. 13–20.
192. Otsuka Y., Yonesaki T. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins//Mol. Microbiol. – 2012. – V. 83. – P. 669–81.
193. Dy R.L., Przybilski R., Semeijn K., Salmond G.P.C., Fineran P.C. A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism//Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42. – P. 4590–605.
194. Guegler C., Laub M. Shutoff of host transcription triggers a toxin-antitoxin system to cleave phage RNA and abort infection//Mol. Cell. – 2021. – V. 81. – P. 2361–73.e9.
195. Blower T.R., Evans T.J., Przybilski R., Fineran P.C., Salmond, G.P.C. Viral evasion of a bacterial suicide system by RNA-based molecular mimicry enables infectious altruism//PLoS Genet. – 2012. – V. 8. – P. e1003023.
196. Blower T.R., Chai R., Przybilski R., Chindhy S., Fang X., Kidman S.E., Tan H., Luisi B.F., Fineran P.C., Salmond G.P.C. Evolution of *Pectobacterium* bacteriophage Φ M1 to escape two bifunctional type III toxin-antitoxin and abortive infection systems through mutations in a single viral gene//Appl. Environ. Microbiol. – 2017. – V. 83. – P. e03229-16.
197. Chen B., Akusobi C., Fang X., Salmond G.P.C. Environmental T4-family bacteriophages evolve to escape abortive infection via multiple routes in a bacterial host employing ‘altruistic suicide’ through type III toxin-antitoxin systems//Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 1006.
198. Hilliard J.J., Maurizi M.R., Simon L.D. Isolation and characterization of the phage T4 PinA protein, an inhibitor of the ATP-dependent Lon protease of *Escherichia coli*//J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 518–23.
199. Sberro H., Leavitt A., Kiro R., Koh E., Peleg Y., Qimron U., Sorek R. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning//Mol. Cell. – 2013. – V. 50. – P. 136–48.
200. Alawneh A., Qi D., Yonesaki T., Otsuka Y. An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module//Mol. Microbiol. – 2016. – V. 99. – P. 188–98.

201. Koga M., Otsuka Y., Lemire S., Yonesaki T. *Escherichia coli* rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system//Genetics. – 2011. – V. 187. – P. 123–30.
202. Bleriot I., Blasco L., Pacios O., Fernandez-Garcia L., Ambroa A., Lopez M., Ortiz-Cartagena C., Cuenca F.F., Oteo-Iglesias J., Pascual Á., Martínez-Martínez L., Domingo-Calap P., Wood T.K., Tomás M. The role of PemIK (PemK/PemI) type II TA system from *Klebsiella pneumoniae* clinical strains in lytic phage infection//Sci. Rep. – 2022. – V. 12. – P. 4488.
203. Dedrick R., Jacobs-Sera D., Bustamante C., Garlena R., Mavrich T., Pope W., Reyes J., Russell D., Adair T., Alvey R., Bonilla J., Bricker J., Brown B., Byrnes D., Cresawn S., Davis W., Dickson L., Edgington N., Findley A., Golebiewska U., Grose J., Hayes C., Hughes L., Hutchison K., Isern S., Johnson A., Kenna M., Klyczek K., Mageeney C., Michael S., Molloy S., Montgomery M., Neitzel J., Page S., Pizzorno M., Poxleitner M., Rinehart C., Robinson C., Rubin M., Teyim J., Vazquez E., Ware V., Washington J., Hatfull G. Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence//Nat. Microb. – 2017. – V. 2. – P. 16251.
204. LeRoux M., Srikant S., Teodoro G., Zhang T., Littlehale M., Doron S., Badiie M., Leung A., Sorek R., Laub M. The DarTG toxin-antitoxin system provides phage defence by ADP-ribosylating viral DNA//Nat. Microb. – 2022. – V. 7. – P. 1028–40.
205. Kim Y., Wood T.K. Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*//Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – V. 391. – P. 209–13.
206. Semanjski M., Germain E., Bratl K., Kiessling A., Gerdes K., Macek B. The kinases HipA and HipA7 phosphorylate different substrate pools in *Escherichia coli* to promote multidrug tolerance//Sci. Signal. – 2018. – V. 11. – P. eaat5750.
207. Harrison J., Wade W., Akierman S., Vacchi-Suzzi C., Stremick C., Turner R., Ceri H. The chromosomal toxin gene yafQ is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm//Antimicrob. Agen. Chemother. – 2009. – V. 53. – P. 2253–8.
208. Tripathi A., Dewan P., Siddique S., Varadarajan R. MazF-induced growth inhibition and persister generation in *Escherichia coli*//J. Biol. Chem. – 2014. – V. 289. – P. 4191–205.
209. Brown J., Shaw K. A novel family of *Escherichia coli* toxin-antitoxin gene pairs//J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – P. 6600–8.
210. Barrios A.F., Zuo R., Ren D., Wood T.K. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility//Biotechnol. Bioeng. – 2006. – V. 93. – P. 188–200.

211. Hong S.H., Lee J., Wood T.K. Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal//Microb. Biotechnol. – 2010. – V. 3. – P. 717–28.
212. Gutierrez A., Laureti L., Crussard S., Abida H., Rodriguez-Rojas A., Blazquez J., Baharoglu Z., Mazel D., Darfeuille F., Vogel J., Matic I. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity//Nat. Commun. – 2013. – V. 4. – P. 1610.
213. Frohlich K.S., Papenfort K., Berger A.A., Vogel J. A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD//Nucleic Acids Res. – 2012. – V. 40. – P. 3623–40.
214. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024. – URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024/> (дата обращения 16.04.2025).
215. Murray J.F., Schraufnagel D.E., Hopewell P. Treatment of tuberculosis. a historical perspective//Ann. Am. Thorac. Soc. – 2015. – V. 12. N. 12. – P. 1749–59.
216. Murray J. A century of tuberculosis//Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2004. – V. 169. – N. 11. – P. 1181–6.
217. Nahid P., Dorman S., Alipanah N., Barry P., Brozek J., Cattamanchi A., Chaisson L., Chaisson R., Daley C., Grzemska M., Higashi J., Ho C., Hopewell P., Keshavjee S., Lienhardt C., Menzies R., Merrifield C., Narita M., O'Brien R., Peloquin C., Raftery A., Saukkonen J., Schaaf H., Sotgiu G., Starke J., Migliori G.B, Vernon A. Executive summary: Official American thoracic Society/Centers for disease control and Prevention/Infectious diseases society of America clinical practice guidelines: Treatment of drug-susceptible tuberculosis//Clin. Infect. Dis. – 2016. – V. 63. N. 7. – P. 853–67.
218. Zhang Y., Shi W., Zhang W., Mitchison D. Mechanisms of PZA action and resistance//Microbiol. Spectr. – 2014. – V. 2. N. 4. – P. MGM2–0023-2013.
219. Hu Y., Liu A., Ortega-Muro F., Alameda-Martin L., Mitchison D., Coates A. High-dose RIF kills persisters, shortens treatment duration, and reduces relapse rate in vitro and *in vivo*//Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 641.
220. McKeegan K.S., Borges-Walmsley M.I., Walmsley A.R. Microbial and viral drug resistance mechanisms//Trends Microbiol. – 2002. – V. 10. – P. S8–S14.
221. Scholar E.M., Pratt, W.B. (eds) The Antimicrobial Drugs. – NY.: Oxford Univ. Press, 2000. – 607 p.

222. D'Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D. Sampling the antibiotic resistome//*Science*. – 2006. – V. 311. – P. 374–7.
223. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization//*Lancet*. – 1944. – V. 244. – P. 497–500.
224. Hobby G.L., Meyer K., Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin//*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1942. – V. 50. – P. 281–5.
225. Horne D., Tomasz A. Tolerant response of *Streptococcus sanguis* to β -lactams and other cell-wall inhibitors//*Antimicrob. Agents Chemother.* – 1977. – V. 11. – P. 888–96.
226. Balaban N., Gerdes K., Lewis K., McKinney J. A problem of persistence: still more questions than answers?//*Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11. – P. 587–91.
227. Kester J., Fortune S. Persists and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria//*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2014. – V. 49. – P. 91–101.
228. Tuomanen E., Cozens R., Tosch W., Zak O., Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth//*J. Gen. Microbiol.* – 1986. – V. 132. – P. 1297–304.
229. McDermott W. Microbial persistence//*Yale J. Biol. Med.* – 1958. – V. 30. – P. 257–291.
230. Lederberg J., Zinder N. Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin//*J. Am. Chem. Soc.* – 1948. – V. 70. – P. 4267–8.
231. Handwerger S., Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria//*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1985. – V. 25. – P. 349–80.
232. Gefen O., Balaban N. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress//*FEMS Microbiol. Rev.* – 2009. – V. 33. – P. 704–17.
233. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch//*Science*. – 2004. – V. 305. – P. 1622–5.
234. Wakamoto Y., Dhar N., Chait R., Schneider K., Signorino-Gelo F., Leibler S., McKinney J.D. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria//*Science*. – 2013. – V. 339. – P. 91–5.
235. Depardieu F., Podglajen I., Leclercq R., Collatz E., Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression//*Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – V. 20. – P. 79–114.

236. Blair J., Webber M., Baylay A., Ogbolu D. Piddock L. Molecular mechanisms of antibiotic resistance//*Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – V. 13. – P. 42–51.
237. Chait R., Craney A., Kishony R. Antibiotic interactions that select against resistance//*Nature.* – 2007. – V. 446. – P. 668–71.
238. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances//*Nat. Protoc.* – 2008. – V. 3. – P. 163–75.
239. Mattie H. Antibiotic efficacy in vivo predicted by in vitro activity//*Int. J. Antimicrob. Agents* – 2000. – V. 14. – P. 91–8.
240. Paterson D., Ko W., Von Gottberg A., Casellas J., Mulazimoglu L., Klugman K., Bonomo R., Rice L., McCormack J., Yu V. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory//*J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – P. 2206–12.
241. Ishida K., Guze P.A., Kalmanson G.M., Albrandt K., Guze L.B. Variables in demonstrating methicillin tolerance in *Staphylococcus aureus* strains//*Antimicrob. Agents Chemother.* – 1982. – V. 21. – P. 688–90.
242. Wolfson J., Hooper D., McHugh G., Bozza M., Swartz M. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and β -lactam antimicrobial agents//*Antimicrob. Agents Chemother.* – 1990. – V. 34 – P. 1938–43.
243. Mueller M., de la Pena A., Derendorf, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC//*Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – P. 369–77.
244. Barry A., Craig W., Nadler H., Reller L., Sanders C., Swenson J. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. – Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999. – 32 p.
245. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y. P., Lewis, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials//*Fems Microbiol. Lett.* – 2004. – V. 230. – P. 13–8.
246. Pasticci M., Moretti A., Stagni G., Ravasio V., Soavi L., Raglio A., Vailati F., Cardaccia A., Santucci A., Papili R., Sgrelli A., Pallotto C., Baldelli F. Bactericidal activity of oxacillin and glycopeptides against *Staphylococcus aureus* in patients with endocarditis: looking

for a relationship between tolerance and outcome//Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2011. – V. 10. – P. 26.

247. Fridman O., Goldberg A., Ronin I., Shores N., Balaban N. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations//Nature. – 2014. – V. 513. – P. 418–21.

248. Regoes R., Wiuff C., Zappala R., Garner K., Baquero F., Levin B.R. Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens//Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – V. 48. – P. 3670–6.

249. Gefen O., Gabay C., Mumcuoglu M., Engel G., Balaban N. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – P. 6145–9.

250. Helaine S., Thompson J., Watson K., Liu M., Boyle C., Holden D. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – P. 3746–51.

251. Amato S.M., Orman M.A., Brynildsen M.P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*//Mol. Cell. – 2013. – V. 50. – P. 475–87.

252. Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin–antitoxin activity//Cell. – 2013. – V. 154. – P. 1140–50.

253. Chao L., Levin B.R. Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria//Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1981. – V. 78. – P. 6324–8.

254. Rodionov D., Ishiguro E. Effects of inhibitors of protein synthesis on lysis of *Escherichia coli* induced by β -lactam antibiotics//Antimicrob. Agents Chemother. – 1996. – V. 40. – P. 899–903.

255. Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban, N. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment//Nat. Rev. Microbiol. – 2016. – V. 14. N. 5. – P. 320–30.

256. Boldrin F., Provvedi R., Cioetto Mazzabo L., Segafreddo G., Manganelli R. Tolerance and persistence to drugs: A main challenge in the fight against *Mycobacterium tuberculosis*//Front. Microbiol. – 2020. – V. 11. – P. 1924.

257. Goossens S., Sampson S., Van Rie A. Mechanisms of drug-induced tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*//Clin. Microbiol. Rev. – 2020. – V. 34. – P. 1–21.

258. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease//Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – V. 5. N. 1. – P. 48–56.
259. Shan Y., Brown Gandt A., Rowe S., Deisinger J., Conlon B., Lewis K. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*//mBio. – 2017. – V. 8. – P. 1–14.
260. Manuse S., Shan Y., Canas-Duarte S.J., Bakshi S., Sun W.S., Mori H., Paulsson J., Lewis K. Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells//PloS Biol. – 2021. – V. 19. N. 4. – P. e3001194.
261. Moker N., Dean C.R., Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules//J. Bacteriol. – 2010. – V. 192. N. 7. – P. 1946–55.
262. Aldridge B., Fernandez-Suarez M., Heller D., Ambravaneswaran V., Irimia D., Toner M., Fortune S. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility//Science. – 2012. – V. 335. N. 6064. – P. 100–4.
263. Xie Z., Siddiqi N., Rubin E. Differential antibiotic susceptibilities of starved *Mycobacterium tuberculosis* isolates//Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – V. 49. N. 11. – P. 4778–80.
264. Pullan S., Allnut J., Devine R., Hatch K., Jeeves R., Hendon-Dunn C., Marsh P., Bacon J. The effect of growth rate on PZA activity in *Mycobacterium tuberculosis* - insights for early bactericidal activity?//BMC Infect. Dis. – 2016. – V. 16. – P. 205.
265. Rego E., Audette R., Rubin, E. Deletion of a mycobacterial divisome factor collapses single-cell phenotypic heterogeneity//Nature. – 2017. – V. 546. – P. 153–7.
266. Jain P., Weinrick B.C., Kalivoda E.J., Yang H., Munsamy V., Vilcheze C., Weisbrod T., Larsen M., O'Donnell M., Pym A., Jacobs W. Jr. Dual-reporter mycobacteriophages (Phi2DRMs) reveal preexisting *Mycobacterium tuberculosis* persistent cells in human sputum//mBio. – 2016. – V. 7. N. 5. – P. 1–13.
267. Zahrt T., Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. N. 22. – P. 12706–11.
268. Bretl D., Demetriadou C., Zahrt T. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*//Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2011. – V. 75. N.4. – P. 566–82.

269. Javid B., Sorrentino F., Toosky M., Zheng W., Pinkham J., Jain N., Pan M., Deighan P., Rubin E. Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for RIF phenotypic resistance//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – V. 111. – P. 1132–7.

270. Warner D., Mizrahi V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy//Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – V. 19. – P. 558–70.

271. Adams K., Takaki K., Connolly L., Wiedenhoft H., Winglee K., Humbert O., Edelstein P., Cosma C., Ramakrishnan L. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism//Cell. – 2011. – V. 145. N. 1. – P. 39–53.

272. Liu Y., Tan S., Huang L., Abramovitch R., Rohde K., Zimmerman M., Chen C., Dartois V, VanderVen B., Russell D. Immune activation of the host cell induces drug tolerance in *Mycobacterium tuberculosis* both in vitro and in vivo//J. Exp. Med. – 2016. – V. 213. N. 5. – P. 809–25.

273. Wood T., Knabel S., Kwan B. Bacterial persister cell formation and dormancy//Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – V. 79. N. 23. – P. 7116–21.

274. Vilcheze C., Hartman T., Weinrick B., Jacobs W. Jr. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced fenton reaction//Nat. Commun. – 2013. – V. 4. – P. 1881.

275. Vilcheze C., Hartman T., Weinrick B., Jain P., Weisbrod T., Leung L., Freundlich J., Jacobs W. Jr. Enhanced respiration prevents drug tolerance and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – V. 114. N. 17. – P. 4495–500.

276. Dutta N., Klinkenberg L., Vazquez M., Segura-Carro D., Colmenarejo G., Ramon F., Rodriguez-Miquel B., Mata-Cantero L., Porras-De Francisco E., Chuang Y., Rubin H., Lee J., Eoh H., Bader J., Perez-Herran E., Mendoza-Losana A., Karakousis P. Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence//Sci. Adv. – 2019. – V. 5. – P. eaav2104.

277. Dahl J., Kraus C., Boshoff H., Doan B., Foley K., Avarbock D., Kaplan G., Mizrahi V., Rubin H., Barry C. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. N. 17. – P. 10026–31.

278. Orman M., Brynildsen M. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence//Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – V. 57. N. 7. – P. 3230–9.

279. Zhu J., Wang B., Pan M., Zeng Y., Rego H., Javid B. RIF can induce antibiotic tolerance in mycobacteria via paradoxical changes in *rpoB* transcription//Nat. Commun. – 2018. – V. 9. N. 1. – P. 4218.
280. Seth V., Beotra A., Seth S., Semwal O., Kabra S., Jain Y. Serum concentrations of RIF and isoniazid in tuberculosis//Indian Pediatr. – 1993. – V. 30. – P. 1091–8.
281. Lei Q., Wang H., Zhao Y., Dang L., Zhu C., Lv X., Wang H., Zhou J. Determinants of serum concentration of first-line anti-tuberculosis drugs from China//Medicine. – 2019. – V. 98. N. 41. – P. e17523.
282. Richardson K., Bennion O., Tan S., Hoang A., Cokol, Aldridge B. Temporal and intrinsic factors of RIF tolerance in mycobacteria//Proc. Natl. Acad. Sci. – 2016. – V. 113. – P. 8302–7.
283. Hu Y., Liu A., Ortega-Muro F., Alameda-Martin L., Mitchison D., Coates A. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or Pyrazinamide//J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. N. 22. – P. 6358–65.
284. Connolly L., Edelstein P., Ramakrishnan L. Why is long-term therapy required to cure tuberculosis?//PloS Med. – 2007. – V. 4. N. 3. – P. e120.
285. Cohen N., Lobritz M., Collins J. Microbial persistence and the road to drug resistance//Cell Host Microbe. – 2013. – V. 13. N. 6. – P. 632–42.
286. Sebastian J., Swaminath S., Nair R., Jakkala K., Pradhan A., Ajitkumar P. *De novo* emergence of genetically resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* from the persistence phase cells formed against antituberculosis drugs in vitro//Antimicrob. Agents Chemother. – 2017. – V. 61. N. 2. – P. 1–25.
287. Zhang Y., Yew W., Barer M. Targeting persisters for tuberculosis control//Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – V. 56. N. 5. – P. 2223–30.
288. Ventola C.L. The antibiotic resistance crisis: Causes and threats//Pharm. Ther. J. – 2015. – V. 40. – P. 277–83.
289. Coussens N., Daines D. Wake me when it's over – Bacterial toxin-antitoxin proteins and induced dormancy//Exp. Biol. Med. – 2016. – V. 241. – P. 1332–42.
290. Yamaguchi Y., Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems//Nat. Rev. Microbiol. – 2011. – V. 9. 779–90.
291. Piscotta F., Jerrey P., Link, A. ParST is a widespread toxin-antitoxin module that targets nucleotide metabolism//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2019. – V. 116. – P. 826–34.

292. Unterholzner S., Poppenberger B., Rozhon W. Toxin-antitoxin systems. Biology, identification and application//*Mob. Genet. Elem.* – 2013. – V. 3. – P. 1-13.
293. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*//*J. Bacteriol.* – 2004. – V. 186. – P. 8172–80.
294. Robson J., McKenzie J., Cursons R., Cook G., Arcus V. The vapBC operon from *Mycobacterium smegmatis* is an autoregulated toxin-antitoxin module that controls growth via inhibition of translation//*J. Mol. Biol.* – 2009. – V. 390. – P. 353–67.
295. Kedzierska B., Lian L., Hayes F. Toxin-antitoxin regulation: Bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression//*Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – P. 325–39.
296. Williams J., Hergenrother P. Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy//*Trends Microbiol.* – 2014. – V. 20. – P. 291–8.
297. Harms A., Brodersen D., Mitarai N., Gerdes K. Toxins, targets, and triggers: An overview of toxin-antitoxin biology//*Mol. Cell.* – 2018. - V. 70. – P. 768–84.
298. Lee K., Lee B. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria//*Toxins (Basel)*. – 2016. – V. 8. – P. 305.
299. Chan W., Balsa D., Espinosa M. One cannot rule them all: Are bacterial toxins-antitoxins druggable?//*FEMS Microbiol. Rev.* – 2015. – V. 39. – P. 522–40.
300. Bravo A., Ruiz-Cruz S., Alkorta I., Espinosa M. When humans met superbugs: Strategies to tackle bacterial resistances to antibiotics//*Biomol. Concepts*. – 2018. – V. 9. – P. 216–26.
301. Carlos L., Barbosa B., Sânder A., Cangussu R., Garrido S., Marchetto R. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications//*Afr. J. Biotechnol.* – 2014. – V. 13. – P. 11–7.
302. Lioy V., Rey O., Balsa D., Pellicer T., Alonso J. A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development//*Plasmid*. – 2010. – V. 63. – P. 31–9.
303. Agarwal S., Agarwal S., Bhatnagar R. Identification and characterization of a novel toxin-antitoxin module from *Bacillus anthracis*//*FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – P. 1727–34.
304. Agarwal S., Mishra N.K., Bhatnagar S., Bhatnagar R. PemK toxin of *Bacillus anthracis* is a ribonuclease: An insight into its active site, structure, and function//*J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 7254–70.

305. Verma S., Kumar S., Gupta V., Gourinath S., Bhatnagar S., Bhatnagar R. Structural basis of *Bacillus anthracis* MoxXT disruption and the modulation of MoxT ribonuclease activity by rationally designed peptides//J. Biomol. Struct. Dyn. – 2015. – V. 33. – P. 606–24.
306. Chopra N., Agarwal S., Verma S., Bhatnagar S., Bhatnagar R. Modeling of the structure and interactions of the *B. anthracis* antitoxin, MoxX: Deletion mutant studies highlight its modular structure and repressor function//J. Comput. Aided. Mol. Des. – 2011. – V. 25. – P. 275–91.
307. Lee I., Lee S., Chae S., Lee K., Kim, J., Lee, B. Structural and functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC30 toxin-antitoxin system: Implications for the design of novel antimicrobial peptides//Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – P. 7624–37.
308. Chan W., Moreno-Córdoba I., Yeo C., Espinosa M. Toxin-antitoxin genes of the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*: So few and yet so many//Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2012. - V. 76. – P. 773–91.
309. Równicki M., Pienko T., Czarneck, J., Kolanowska M., Bartosik D., Trylska J. Artificial activation of *Escherichia coli* mazEF and hipBA toxin–antitoxin systems by antisense peptide nucleic acids as an antibacterial strategy//Front. Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 2870.
310. Good L., Awasthi S., Dryselius R., Larsson O., Nielsen P. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates//Nat. Biotechnol. – 2001. – V. 19. – P. 360–4.
311. Wojciechowska M., Równicki M., Mieczkowski A., Miskiewicz J., Trylska J. Antibacterial peptide nucleic acids—Facts and perspectives//Molecules. – 2020. – V. 25. – P. 559.
312. Brzozowska I., Zielenkiewicz U. The ClpXP protease is responsible for the degradation of the Epsilon antidote to the Zeta toxin of the streptococcal pSM19035 plasmid//J. Biol. Chem. – 2014. – V. 289. – P. 7514–23.
313. Van Melder L., Thi M., Lecchi P., Gottesman S., Couturier M., Maurizi M. ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions//J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – 27730–8.
314. Muthuramalingam M., White J., Bourne C. Toxin-antitoxin modules are pliable switches activated by multiple protease pathways//Toxins (Basel). – 2016. – V. 8. – P. 214.
315. Goff S., Goldberg A. An increased content of protease La, the *lon* gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*//J. Biol. Chem. – 1987. – V. 262. – P. 4508–15.

316. Brötz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H., Endermann R., Ladel C., Schroeder W., Hinzen B., Raddatz S., Paulsen H., Henninger K., Bandow J., Sahl H., Labischinski H. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics//*Nat. Med* – 2005. – 11. – P. 1082–7.
317. Kumar S., Engelberg-Kulka H. Quorum sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death as a novel class of antimicrobial agents//*Curr. Opin. Microbiol.* – 2014. – V. 21. – P. 22–7.
318. Kumar S., Kolodkin-Gal I., Engelberg-Kulka H. Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death//*MBio.* – 2013. – V. 4. – P. e00314-13.
319. Nigam A., Kumar S., Engelberg-Kulka H. Quorum sensing extracellular death peptides enhance the endoribonucleolytic activities of *Mycobacterium tuberculosis* MazF toxins//*MBio.* – 2018. – V. 9. – P. e00685-18.
320. Ronneau S., Helaine, S. Clarifying the link between toxin–antitoxin modules and bacterial persistence//*J. Mol. Biol.* – 2019. – V. 431. – P. 3462–71.
321. Török I., Kari C. Accumulation of ppGpp in a relA mutant of *Escherichia coli* during amino acid starvation//*J. Biol. Chem.* – 1980. – V. 255. – P. 3838–40.
322. Ramisetty B., Natarajan B., Santhosh R. MazEF-mediated programmed cell death in bacteria: “What is this?”//*Crit. Rev. Microbiol.* – 2015. – V. 41. – P. 89–100.
323. López-Igual R., Bernal-Bayard J., Rodríguez-Patón A., Ghigo J., Mazel D. Engineered toxin–intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations//*Nat. Biotechnol.* – 2019. – V. 37. – P. 755–60.
324. Collin F., Karkare S., Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: Current state and perspectives//*Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 92. – P. 479–97.
325. Bernard P., Kézdy K., Van Melderen L., Steyaert J., Wyns L., Pato M., Higgins P., Couturier M. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase//*J. Mol. Biol.* – 1993. – V. 234. – P. 534–41.
326. Childers B., Klose K. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: The ToxR regulon//*Future Microbiol.* – 2007. – V. 2. – P. 335–44.
327. Beaber J., Hochhut B., Waldor M. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes//*Nature.* – 2004. – V. 427. – P.72–4.

328. Kudykina Y., Shleeva M., Artsabanov V., Suzina N., Kaprelyants A. Generation of dormant forms by *Mycobacterium smegmatis* in the poststationary phase during gradual acidification of the medium//Microbiology. – 2011. – V. 80. – P. 625–36.
329. Parish T., Stoker N.G. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement//Microbiology (Reading). – 2000. – V. 146. – P. 1969–75.
330. de Man J.C. MPN tables, corrected//European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1983. – V. 17. – P. 301–5.
331. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4//Nature. – 1970. – V. 227. N 5259. – P. 680–5.
332. Kessner D., Chambers M., Burke R., Agus D., Mallick P. ProteoWizard: open-source software for rapid proteomics tools development//Bioinformatics. – 2008. – V. 24. – P. 2534–6.
333. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing//J. R. Stat. – 1995. – V. 57. – P. 89–300.
334. Rustad T.R., Roberts D.M., Liao R.P., Sherman D.R. Isolation of mycobacterial RNA//Methods Mol. Biol. – 2009. – V. 465. – P. 13–21.
335. Levin J., Yassour M., Adiconis X., Nusbaum C., Thompson D., Friedman N., Gnirke A., Regev A. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods//Nat. Methods. – 2010. – V. 7. N. 9. – P. 709–15.
336. Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2//Nat. Methods. – 2012. – V. 9. N. 4. – P. 357–359.
337. Kapopoulou A., Lew J., Cole S. The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes//Tuberculosis (Edinb.) – 2011. – V. 91. N. 1. – P. 8–13.
338. Liao Y., Smyth G., Shi W. FeatureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features//Bioinformatics. – 2014. – V. 30. N. 7. – P. 923–30.
339. Robinson J., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E., Getz G., Mesirov J. Integrative genomics viewer//Nat. Biotechnol. – 2011. – V. 29. – P. 24–6.
340. Gottesman S. Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria//J. Biol. Chem. – 2019. – V. 294. – P. 11685–700.
341. Zou J., Peng B., Qu J., Zheng J. Are Bacterial Persisters Dormant Cells Only?//Front. Microbiol. – 2022. – V. 12. – P. 708580.

342. Nix D., DeVito J. Ciprofloxacin and norfloxacin, two fluoroquinolone antimicrobials//Clin Pharm. – 1987. – V. 6. N. 2. – P. 105–17.
343. Timmins G., Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid//Mol. Microbiol. – 2006. – V. 62. N. 5. – P. 1220–7.
344. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance//Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2001. – V. 65. – P. 232–260.
345. Demidenok O., Shumkov M., Goncharenko A. VapC toxin inhibition as a method for prevention of the formation of resting forms of mycobacteria//Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2016. – V. 52. N. 6. – P. 579– 83.
346. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology project in 2008//Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36. – P. D440–4.
347. Dessimoz C., Škunca N. (eds.) The Gene Ontology Handbook. – NY.: Humana New York, 2017. – 305 p.
348. Feltcher M., Sullivan J., Braunstein M. Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development?//Future Microbiol. – 2010. – V. 5. N. 10. – P. 1581–97.
349. Clark D., Pazdernik N., McGehee M. (eds.) Molecular biology, 3rd edn. - San Diego: Elsevier/Academic Press, 2019. – 1006 p.
350. Irastortza-Olaziregi M., Amster-Choder O. Coupled Transcription-Translation in Prokaryotes: An Old Couple With New Surprises//Front. Microbiol. – 2021. – V. 11. – P. 624830.
351. Potrykus K., Cashel M. (p)ppGpp: still magical?//Annu. Rev. Microbiol. – 2008. – V. 62. – P. 35–51.
352. McKinney J., Höner zu Bentrup K., Muñoz-Elías E., Miczak A., Chen B., Chan W., Swenson D., Sacchettini J., Jacobs W., Russell D. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase//Nature. – 2000. – V. 406. – P. 735–8.
353. Ehrt S., Schnappinger D., Rhee K. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*//Nat. Rev. Microbiol. – 2018. – V. 16. – P. 496–507.
354. Deb C., Lee C., Dubey V., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T., Pawar S., Rogers L., Kolattukudy, P. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen//PLoS ONE. – 2009. – V. 4. – P. e6077.

355. Sartain M., Dick D., Rithner C., Crick D., Belisle J. Lipidomic analyses of *Mycobacterium tuberculosis* based on accurate mass measurements and the novel “Mtb LipidDB”//J. Lipid Res. – 2011. – V. 52. – P. 861–72.
356. Nikitushkin V., Shleeva M., Zinin A., Trutneva K., Ostrovsky D., Kaprelyants A. The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin//FEMS Microbiol. Lett. – 2016. – V. 363. – P. fnw206.
357. Rittershaus E., Baek S., Sasseti C. The normalcy of dormancy: Common themes in microbial quiescence//Cell Host Microbe. – 2013. – V. 13. – P. 643–51.
358. Baker T., Sauer R. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine//Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – V. 1823. – P. 15–28.
359. Cheetham M., Caplan A. Structure function and evolution of DnaJ: Conservation and adaptation of chaperone function//Cell Stress Chaperones. – 1998. – V. 3. – P. 28–36.
360. Langer T., Lu C., Echols H., Flanagan J., Hayer M., Hartl F. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding//Nature. – 1992. – V. 356. – P. 683–9.
361. Zietkiewicz S., Krzewska J., Liberek K. Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation//J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – P. 44376–83.
362. Larosa V., Remale C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress//Biosci. Rep. – 2018. – V. 38. – P. BSR20171492.
363. Schurig-Briccio L., Fariás R., Rodríguez-Montelongo L., Rintoul M., Rapisarda V. Protection against oxidative stress in *Escherichia coli* stationary phase by a phosphate concentration-dependent genes expression//Arch. Biochem. Biophys. – 2009. – V. 483. – P. 106–10.
364. Arnér E., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase//Eur. J. Biochem. – 2000. – V. 267. – P. 6102–9.
365. Hirabayashi K., Yuda E., Tanaka N., Katayama S., Iwasaki K., Matsumoto T., Kurisu G., Outten F., Fukuyama K., Takahashi Y., Wada K. Functional Dynamics Revealed by the Structure of the SufBCD Complex, a Novel ATP-binding Cassette (ABC) Protein That Serves as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis//J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – P. 29717–31.

366. Piddington D., Fang F., Laessig T., Cooper A., Orme I., Buchmeier, N.A. Cu, Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst//Infect. Immun. – 2001. – V. 69. – P. 4980–7.
367. Seaver L., Imlay J. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*//J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – P. 7173–81.
368. Hui D., Khaiat S., Uy T., Xu H. Partial Confirmation of Single katG and katE Knockouts and Double katG/katE Knockouts Created from Isogenic Background of *Escherichia coli* K-12 Strains//JEMI. – 2014. – V. 18. – P. 139–45.
369. Kumar A., Farhana A., Guidry L., Saini V., Hondalus M., Steyn A. Redox homeostasis in mycobacteria: The key to tuberculosis control?//Expert. Rev. Mol. Med. – 2011. – V. 13. – P. e39.
370. Shastri M., Shukla S., Chong W., Dua K., Peterson G., Patel R., Hansbro P., Eri R., O'Toole R. Role of Oxidative Stress in the Pathology and Management of Human Tuberculosis//Oxid. Med. Cell Longev. – 2018. – V. 2018. – P. 7695364.
371. Jaishankar J., Srivastava P. Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications//Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 2000.
372. Weiss L., Stallings C. Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp//J. Bacteriol. – 2013. – V. 195. – P. 5629–38.
373. Reitzer L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*//Annu. Rev. Microbiol. – 2003. – V. 57. – P. 155–76.
374. Reitzer L. Catabolism of Amino Acids and Related Compounds//EcoSal Plus. – 2005. – V. 1.
375. Nürenberg-Goloub E., Tampé R. Ribosome recycling in mRNA translation, quality control, and homeostasis//Biol. Chem. – 2019. – V. 401. – P. 47–61.
376. Harper C., Hayward D., Kidd M., Wiid I., van Helden P. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*//BMC Microbiol. – 2010. – V. 10. – P. 138.
377. De Biase D., Pennacchietti E. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: Function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon//Mol. Microbiol. – 2012. – V. 86. – P. 770–86.

378. Kaprelyants A., Mukamolova G., Kell D. Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution//FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – V. 115. – P. 347–52.
379. Shi X., Khade P., Sanbonmatsu K., Joseph S. Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis//J. Mol. Biol. – 2012. – V. 419. – P. 125–38.
380. Rodnina M., Peske F., Peng B., Belardinelli R., Wintermeyer W. Converting GTP hydrolysis into motion: versatile translational elongation factor G//Biol. Chem. – 2019. – V. 401. – P. 131–42.
381. Trutneva K., Shleeva M., Nikitushkin V., Demina G., Kaprelyants A. Protein Composition of *Mycobacterium smegmatis* Differs Significantly Between Active Cells and Dormant Cells With Ovoid Morphology//Front. Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 02083.
382. Gohara D., Yap M. Survival of the drowsiest: the hibernating 100S ribosome in bacterial stress management//Curr. Genet. – 2018. – V. 64. N. 4). – P. 753–60.
383. Yamasaki R., Song S., Benedik M., Wood T. Persister cells resuscitate using membrane sensors that activate chemotaxis, lower cAMP levels, and revive ribosomes//iScience. – V. 23. N. 1. – P. 100792.
384. Wood T., Song S. Forming and waking dormant cells: The ppGpp ribosome dimerization persister model//Biofilm. – 2020. – V. 2. – P. 100018.
385. Li Y., Sharma M., Koripella R., Banavali N., Agrawal R., Ojha A. Ribosome hibernation: a new molecular framework for targeting nonreplicating persisters of mycobacteria//Microbiology (reading). – 2021. – V. 167. N. 2. – P. 001035.
386. Mishra S., Ahmed T., Tyagi A., Shi J., Bhushan S. Structures of *Mycobacterium smegmatis* 70S ribosomes in complex with HPF, tmRNA, and P-tRNA//Sci. Rep. – 2018. – V. 8. – P. 13587.
387. Kushwaha A., Bhushan S. Unique structural features of the *Mycobacterium ribosome*//Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2020. – V. 152. – P. 15–24.
388. Temmel H., Müller C., Sauert M., Vesper O., Reiss A., Popow J., Martinez J., Moll I. The RNA ligase RtcB reverses MazF-induced ribosome heterogeneity in *Escherichia coli*//Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45. N. 8. – P. 4708–21.
389. Salina E., Grigorov A., Bychenko O., Skvortsova Y., Mamedov I., Azhikina T., Kaprelyants A. Resuscitation of Dormant "Non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* Is

Characterized by Immediate Transcriptional Burst//Front. Cell Infect. Microbiol. – 2019. – V. 9. – P. 272.

390. Trovatti E., Cotrim C., Garrido S., Barros R., Marchetto R. Peptides based on CcdB protein as novel inhibitors of bacterial topoisomerases//Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2008. – V. 18. N. 23. – P. 6161–4.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 – Список дифференциальных белков, идентифицированных в протеомном профиле клеток *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина *VarC* (wt-pMind-*varC*). В столбике «Кратность изменений» в порядке убывания даны средние величины изменения представленности указанных белков относительно их представленности в протеомном профиле контрольного штамма дикого типа, несущего плазмиду pMind без вставки (wt-pMind)

Ген	Синоним	Белок	Кратность изменений	COG
MSMEG_1436	rplC	50S ribosomal protein L3	146,8115	COG0087J
MSMEG_4290	glnA	glutamine synthetase	93,703	COG0174E
MSMEG_3791	rplT	50S ribosomal protein L20	85,1465	COG0292J
MSMEG_0373	-	acetyl-CoA acetyltransferase	84,5375	COG0183I
MSMEG_2519	rpsB	30S ribosomal protein S2	77,3485	COG0052J
MSMEG_0250	-	membrane protein, MmpL family protein	69,46	COG2409R
MSMEG_6391	-	propionyl-CoA carboxylase subunit beta	68,525	COG4799I
MSMEG_0643	-	extracellular solute-binding protein	68,277	COG4166E
MSMEG_1347	rplA	50S ribosomal protein L1	57,7865	COG0081J
MSMEG_1437	rplD	50S ribosomal protein L4	56,875	COG0088J
MSMEG_1523	rpsD	30S ribosomal protein S4	40,648	COG0522J
MSMEG_1471	rplR	50S ribosomal protein L18	38,781	COG0256J
MSMEG_1467	rplE	50S ribosomal protein L5	34,1665	COG0094J
MSMEG_1807	-	acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase subunit alpha	33,043	COG4770I
MSMEG_1193	-	TROVE domain-containing protein	29,2175	-
MSMEG_2259	-	carbon starvation protein A	29,1715	COG1966T
MSMEG_1881	secA	preprotein translocase subunit SecA	26,8495	COG0653U
MSMEG_0889	-	succinate-semialdehyde dehydrogenase	26,7615	COG1012C
MSMEG_1557	rpsI	30S ribosomal protein S9	25,375	COG0103J
MSMEG_1930	-	DEAD/DEAH box helicase	23,187	COG0513LKJ
MSMEG_5415	eno	phosphopyruvate hydratase	22,7685	COG0148G

MSMEG_6284	-	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	22,6855	COG2230M
MSMEG_1521	rpsM	30S ribosomal protein S13	22,316	COG0099J
MSMEG_1442	rpsC	30S ribosomal protein S3	21,788	COG0092J
MSMEG_5511	-	von Willebrand factor A	21,5175	COG4867R
MSMEG_4954	rho	transcription termination factor Rho	19,4975	COG1158K
MSMEG_1399	rpsG	30S ribosomal protein S7	18,416	COG0049J
MSMEG_4668	-	oxidoreductase alpha (molybdopterin) subunit	17,7485	COG0243C
MSMEG_4757	-	fatty acid synthase	16,5745	COG4982I
MSMEG_5470	-	molybdopterin biosynthesis protein MoeA 1	14,739	COG0303H
MSMEG_1476	sppA	signal peptide peptidase SppA, 67K type	13,954	COG0616OU
MSMEG_1439	rplB	50S ribosomal protein L2	13,825	COG0090J
MSMEG_4626	-	ribonuclease, Rne/Rng family protein	13,7975	COG1530J
MSMEG_0691	-	transcriptional regulatory protein	13,5055	COG2771K
MSMEG_6291	-	D-amino-acid dehydrogenase	12,6975	COG0665E
MSMEG_0599	-	acyl-CoA synthetase	11,612	COG0318IQ
MSMEG_3634	-	inosine 5-monophosphate dehydrogenase	11,376	COG0516F
MSMEG_0372	fabG	3-ketoacyl-ACP reductase	10,784	COG1028IQR
MSMEG_4936	atpD	F0F1 ATP synthase subunit beta	9,376	COG0055C
MSMEG_4327	-	3-oxoacyl-ACP synthase	9,2455	COG0304IQ
MSMEG_1366	-	ABC transporter ATP-binding protein	8,9045	COG1127Q
MSMEG_5086	-	long-chain-acyl-CoA synthetase	8,032	COG0318IQ
MSMEG_1043	-	GntR family transcriptional regulator	7,8685	COG1167KE
MSMEG_2310	-	monooxygenase	7,5765	COG2072P
MSMEG_4716	-	acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase subunit alpha	7,27	COG4770I
MSMEG_3833	rpsA	30S ribosomal protein S1	7,1755	COG0539J
MSMEG_5119	pruA	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	6,9705	COG1012C
MSMEG_6283	-	FAD binding domain-containing protein	6,936	COG0277C
MSMEG_1602	guaB	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	6,555	COG0516F
MSMEG_4704	-	acyltransferase	6,126	COG0560E

MSMEG_2389	hup	DNA-binding protein HU	5,9135	COG0776L
MSMEG_4717	-	carboxyl transferase domain-containing protein	5,5065	COG4799I
MSMEG_5672	gltA	type II citrate synthase	5,4255	COG0372C
MSMEG_1603	-	inosine 5-monophosphate dehydrogenase	5,2805	COG0516F
MSMEG_0969	hemL	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	5,134	COG0001H
MSMEG_0786	-	serine/threonine protein kinase	4,9355	COG0515R TKL
MSMEG_1574	-	glutamate decarboxylase	4,829	COG0076E
MSMEG_1353	-	ABC transporter	4,6075	COG0661R
MSMEG_4915	-	alpha-glucan phosphorylase	4,517	COG0058G
MSMEG_6091	-	negative regulator of genetic competence ClpC/mecB	4,4015	COG0542O
MSMEG_4328	-	3-oxoacyl-ACP synthase	4,37	COG0304IQ
MSMEG_3902	-	ATPase AAA	4,2425	COG0464O
MSMEG_4281	-	leucyl aminopeptidase	4,2405	COG0260E
MSMEG_2656	gpsI	polynucleotide phosphorylase	4,1905	COG1185J
MSMEG_2965	relA	GTP pyrophosphokinase	4,1195	COG0317TK
MSMEG_1524	rpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	3,958	COG0202K
MSMEG_0408	-	type I modular polyketide synthase	3,878	COG3321Q
MSMEG_0321	-	transcriptional regulator	3,8565	COG3899R
MSMEG_1927	-	cobyrinic acid a,c-diamide synthase	3,7685	COG1192D
MSMEG_6285	-	DNA polymerase III subunits gamma and tau	3,7055	COG2812L
MSMEG_1472	rpsE	30S ribosomal protein S5	3,636	COG0098J
MSMEG_1178	-	transcriptional regulator	3,621	COG1737K
MSMEG_1813	-	propionyl-CoA carboxylase subunit beta	3,565	COG4799I
MSMEG_1368	rpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	3,529	COG0086K
MSMEG_5431	-	50S ribosomal protein L25	3,4385	COG1825J
MSMEG_3255	-	DoxX subfamily protein	3,262	COG2259S
MSMEG_3767	-	acyl-CoA synthetase	3,259	COG3243I
MSMEG_4362	-	universal stress protein family protein	3,2175	COG0589T
MSMEG_6157	topA	DNA topoisomerase I	3,1875	COG0550L

MSMEG_3081	-	hypothetical protein	3,1825	COG1481S
MSMEG_2628	infB	translation initiation factor IF-2	3,173	COG0532J
MSMEG_2430	ffh	signal recognition particle protein	3,1665	COG0541U
MSMEG_2291	-	short chain dehydrogenase	3,146	COG4221R
MSMEG_2374	ilvC	ketol-acid reductoisomerase	3,129	COG0059EH
MSMEG_2782	-	hypothetical protein	3,113	COG3253S
MSMEG_2403	recG	ATP-dependent DNA helicase RecG	3,0865	COG1200LK
MSMEG_1978	groEL	molecular chaperone GroEL	3,025	COG0459O
MSMEG_0059	-	ATPase AAA	3,015	COG0464O
MSMEG_1252	-	hypothetical protein	3,01	COG1112L
MSMEG_1254	-	DEAD/DEAH box helicase	2,9105	COG1205R
MSMEG_5058	-	ABC transporter ATP-binding protein	2,8195	COG3839G
MSMEG_2839	-	transcriptional accessory protein	2,7935	COG2183K
MSMEG_2685	-	metallo-beta-lactamase superfamily protein	2,783	COG0595R
MSMEG_6242	-	alcohol dehydrogenase	2,7825	COG1454C
MSMEG_3654	azi	preprotein translocase subunit SecA	2,7685	COG0653U
MSMEG_4938	atpA	FOF1 ATP synthase subunit alpha	2,47	COG0056C
MSMEG_4623	obgE	GTPase ObgE	2,394	COG0536R
MSMEG_6189	-	Crp/Fnr family transcriptional regulator protein	2,3765	COG0664T
MSMEG_4672	clpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	2,3335	COG0740OU
MSMEG_4957	-	homoserine dehydrogenase	2,2815	COG0460E
MSMEG_2326	-	molybdenum ABC transporter ATPase	2,269	COG1119P
MSMEG_3746	pyrG	CTP synthetase	2,255	COG0504F
MSMEG_0211	-	ABC transporter ATP-binding protein	2,2115	COG0178L
MSMEG_2352	etfA	electron transfer flavoprotein subunit alpha	2,208	COG2025C
MSMEG_2136	pgm	phosphoglucomutase	2,1825	COG0033G
MSMEG_3706	aceA	isocitrate lyase	2,105	COG2224C
MSMEG_0005	gyrB	DNA gyrase subunit B	2,057	COG0187L
MSMEG_2736	-	GTP-binding protein	1,9815	COG2262R

MSMEG_5512	-	magnesium chelatase	1,972	COG1239H
MSMEG_2959	gabT	4-aminobutyrate aminotransferase	1,9635	COG0160E
MSMEG_1662	-	hypothetical protein	1,9435	COG0161H
MSMEG_2758	-	RNA polymerase sigma factor	1,906	COG0568K
MSMEG_1129	-	D-amino-acid dehydrogenase	1,7445	COG0665E
MSMEG_3673	malQ	4-alpha-glucanotransferase	1,7125	COG1640G
MSMEG_2976	hisS	histidyl-tRNA synthetase	1,6755	COG0124J
MSMEG_0455	-	aldehyde dehydrogenase	1,666	COG1012C
MSMEG_3140	-	ABC transporter ATP-binding protein	1,617	COG0488R
MSMEG_4293	-	bifunctional glutamine-synthetase adenylyltransferase/deadenyltransferase	1,584	COG1391OT
MSMEG_6321	-	glycerol dehydratase large subunit	1,5545	COG4909Q
MSMEG_3839	-	DNA polymerase I	1,552	COG0749L
MSMEG_0464	-	phosphomethylpyrimidine kinase	1,5335	COG0351H
MSMEG_5049	kgd	alpha-ketoglutarate decarboxylase	1,5205	COG0567C
MSMEG_2372	ilvB	acetolactate synthase 1 catalytic subunit	1,5155	COG0028EH
MSMEG_6232	katA	catalase KatA	1,5135	COG0753P
MSMEG_6806	uvrA	excinuclease ABC subunit A	1,502	COG0178L
MSMEG_2449	mmsA	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	1,4195	COG1012C
MSMEG_2412	pyc	pyruvate carboxylase	1,416	COG1038C
MSMEG_1130	-	hypothetical protein	1,4155	COG1537R
MSMEG_4633	-	peptidase S9, prolyl oligopeptidase	1,4145	COG1506E
MSMEG_2760	-	polyphosphate glucokinase	1,411	COG1940KG
MSMEG_0692	-	hypothetical protein	1,396	COG0443O
MSMEG_1670	sdhA	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1,374	COG1053C
MSMEG_3084	gap	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,365	COG0057G
MSMEG_3896	-	hypothetical protein	1,3255	-
MSMEG_1387	-	acyl-CoA dehydrogenase	1,316	COG1960I
MSMEG_5706	-	DNA or RNA helicase of superfamily protein II	1,296	COG1061KL
MSMEG_6685	gabT	4-aminobutyrate aminotransferase	1,2665	COG0160E

MSMEG_2057	nuoG	NADH dehydrogenase subunit G	1,2665	COG1034C
MSMEG_3175	-	ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	1,264	COG0564J
MSMEG_1882	-	acyltransferase	1,2585	-
MSMEG_0035	-	FHA domain-containing protein	1,2395	COG1716T
MSMEG_3097	ppc	phosphoenolpyruvate carboxylase	1,2385	COG2352C
MSMEG_4269	asnB	asparagine synthase	1,2265	COG0367E
MSMEG_1365	rpL	50S ribosomal protein L7/L12	1,21	COG0222J
MSMEG_4664	-	IolD protein	1,208	COG3962E
MSMEG_2263	hybC	hydrogenase-2, large subunit	1,2045	COG0374C
MSMEG_0581	gabT	4-aminobutyrate aminotransferase	1,2045	COG0160E
MSMEG_1364	rpIJ	50S ribosomal protein L10	1,188	COG0244J
MSMEG_5423	mfd	transcription-repair coupling factor	1,1655	COG1197LK
MSMEG_3973	-	N-methylhydantoinase	1,1325	COG0146EQ
MSMEG_2262	hybA	hydrogenase-2, small subunit	1,1185	COG1740C
MSMEG_4624	rpmA	50S ribosomal protein L27	1,1115	COG0211J
MSMEG_1498	mmsA	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	1,1035	COG1012C
MSMEG_1654	-	isocitrate dehydrogenase	1,042	COG2838C
MSMEG_3178	dnaE	DNA polymerase III subunit alpha	0,911	COG0587L
MSMEG_0695	-	isoniazid inducible protein IniA	0,9075	COG1159R
MSMEG_3895	-	proteasome subunit beta	0,904	COG0638O
MSMEG_6272	-	NAD-glutamate dehydrogenase	0,844	COG2902E
MSMEG_5078	glgC	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0,8145	COG0448G
MSMEG_0239	-	O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase	0,803	COG2873E
MSMEG_3085	pgk	phosphoglycerate kinase	0,801	COG0126G
MSMEG_6257	-	aspartate kinase	0,7815	COG0527E
MSMEG_3025	alaS	alanyl-tRNA synthetase	0,78	COG0013J
MSMEG_5715	-	hypothetical protein	0,7685	COG2141C
MSMEG_2450	-	hypothetical protein	0,762	COG0160E
MSMEG_0127	-	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase	0,7445	COG1062C

MSMEG_3611	xfp	phosphoketolase	0,7275	COG3957G
MSMEG_3050	-	integration host factor	0,7205	-
MSMEG_0064	-	PPE family protein	0,702	COG5651N
MSMEG_4222	ftsZ	cell division protein FtsZ	0,6875	COG0206D
MSMEG_6759	glpK	glycerol kinase	0,66	COG0554C
MSMEG_0229	ilvD	dihydroxy-acid dehydratase	0,6595	COG0129EG
MSMEG_0006	gyrA	DNA gyrase subunit A	0,6435	COG0188L
MSMEG_2391	ppk	polyphosphate kinase	0,64	COG0855P
MSMEG_0418	sdhA	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	0,6385	COG1053C
MSMEG_0741	-	hypothetical protein	0,638	COG2141C
MSMEG_3596	-	ATPase	0,6375	COG0433R
MSMEG_1957	-	hypothetical protein	0,632	COG5282S
MSMEG_5612	-	amino-acid acetyltransferase	0,6285	COG1670J
MSMEG_4244	-	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	0,6145	COG3200E
MSMEG_0900	-	eptc-inducible aldehyde dehydrogenase	0,5885	COG1012C
MSMEG_3506	-	amino acid decarboxylase	0,587	COG0076E
MSMEG_5705	-	hypothetical protein	0,5845	COG2378K
MSMEG_0102	-	acyl-CoA dehydrogenase	0,5835	COG1960I
MSMEG_5249	glyA	serine hydroxymethyltransferase	0,564	COG0112E
MSMEG_3030	aroC	chorismate synthase	0,5595	COG0082E
MSMEG_1583	groEL	molecular chaperone GroEL	0,558	COG0459O
MSMEG_5335	-	formamidase	0,5415	COG2421C
MSMEG_3123	sufD	FeS assembly protein SufD	0,5305	COG0719O
MSMEG_2092	-	D-aminopeptidase	0,524	COG3191EQ
MSMEG_1762	-	piperideine-6-carboxylic acid dehydrogenase	0,4995	COG1012C
MSMEG_1937	-	molybdopterin biosynthesis-like protein MoeZ	0,4985	COG0476H
MSMEG_4283	sucB	dihydrolipoamide acetyltransferase	0,4915	COG0508C
MSMEG_5132	typA	GTP-binding protein TypA	0,484	COG1217T
MSMEG_3952	-	hypothetical protein	0,4705	-

MSMEG_4699	-	NAD-glutamate dehydrogenase	0,4515	COG2902E
MSMEG_2280	-	pyruvate dehydrogenase	0,4485	COG0028EH
MSMEG_5240	fumC	fumarate hydratase	0,4485	COG0114C
MSMEG_1285	-	hypothetical protein	0,448	COG3012S
MSMEG_0709	dnaK	molecular chaperone DnaK	0,4345	COG0443O
MSMEG_2931	thrS	threonyl-tRNA synthetase	0,4295	COG0441J
MSMEG_1516	-	thioredoxin reductase	0,4285	COG0492O
MSMEG_1019	-	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	0,4285	COG0209F
MSMEG_0370	-	hypothetical protein	0,4265	COG4913S
MSMEG_4329	-	propionyl-CoA carboxylase subunit beta	0,426	COG4799I
MSMEG_0401	-	non-ribosomal peptide synthase	0,424	COG1020Q
MSMEG_0400	-	peptide synthetase	0,4165	COG1020Q
MSMEG_1764	-	L-lysine aminotransferase	0,3885	COG0160E
MSMEG_2351	etfB	electron transfer flavoprotein subunit beta	0,384	COG2086C
MSMEG_0911	aceA	isocitrate lyase	0,381	COG2224C
MSMEG_4323	aceE	pyruvate dehydrogenase subunit E1	0,3665	COG2609C
MSMEG_1417	-	glyoxalase	0,364	COG2764S
MSMEG_3642	gcvP	glycine dehydrogenase	0,3495	COG1003E
MSMEG_5175	-	NAD-dependent deacetylase	0,3325	COG0846K
MSMEG_6392	-	polyketide synthase	0,312	COG3321Q
MSMEG_3220	trpB	tryptophan synthase subunit beta	0,3005	COG0133E
MSMEG_4584	proA	gamma-glutamyl phosphate reductase	0,3005	COG0014E
MSMEG_5088	-	hypothetical protein	0,2865	COG4783R
MSMEG_4674	tig	trigger factor	0,2845	COG0544O
MSMEG_5270	-	cystathionine beta-synthase	0,2745	COG0031E
MSMEG_5684	-	phosphoserine aminotransferase	0,2675	COG1932HE
MSMEG_1515	-	two-component sensor histidine kinase	0,264	COG0642T
MSMEG_3461	katG	catalase/peroxidase HPI	0,255	COG0376P
MSMEG_0402	-	linear gramicidin synthetase subunit D	0,2405	COG1020Q

MSMEG_4367	-	formamidase	0,2315	COG2421C
MSMEG_0880	groEL	molecular chaperone GroEL	0,2275	COG0459O
MSMEG_5525	sucC	succinyl-CoA synthetase subunit beta	0,209	COG0045C
MSMEG_3122	sufB	FeS assembly protein SufB	0,207	COG0719O
MSMEG_1735	-	flavoprotein disulfide reductase	0,206	COG1249C
MSMEG_5273	-	acetyl-CoA acetyltransferase	0,2025	COG0183I
MSMEG_4474	-	acyl-CoA oxidase	0,202	COG1960I
MSMEG_3158	mutA	methylmalonyl-CoA mutase, small subunit	0,1945	COG1884I
MSMEG_3003	aspS	aspartyl-tRNA synthetase	0,18	COG0173J
MSMEG_1255	-	UvrD/REP helicase	0,1735	COG0210L
MSMEG_1624	-	universal stress protein family protein	0,172	COG0589T
MSMEG_0903	lpdA	dihydrolipoamide dehydrogenase	0,1675	COG1249C
MSMEG_4709	-	enoyl-CoA hydratase	0,1675	COG1024I
MSMEG_6788	-	dihydroxyacetone kinase	0,1665	COG2376G
MSMEG_5183	-	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,1605	COG1028IQR
MSMEG_3103	tkt	transketolase	0,1565	COG0021G
MSMEG_3594	-	anthranilate dioxygenase reductase	0,152	COG1251C
MSMEG_3072	-	bifunctional 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II protein	0,149	COG0108H
MSMEG_2771	-	TrkA protein	0,1465	COG0569P
MSMEG_1401	tuf	elongation factor Tu	0,1435	COG0050J
MSMEG_2378	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,142	COG0111HE
MSMEG_2367	gatB	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	0,139	COG0064J
MSMEG_3227	pyk	pyruvate kinase	0,1305	COG0469G
MSMEG_4723	-	hypothetical protein	0,127	COG0433R
MSMEG_3159	-	methylmalonyl-CoA mutase	0,1225	COG1884I
MSMEG_5852	purD	phosphoribosylamine--glycine ligase	0,1215	COG0151F
MSMEG_0913	-	methoxy mycolic acid synthase 1	0,1185	COG2230M
MSMEG_2198	-	hypothetical protein	0,118	COG0476H
MSMEG_1413	rocD	ornithine--oxo-acid transaminase	0,116	COG4992E

MSMEG_6452	-	[NADP+] succinate-semialdehyde dehydrogenase	0,114	COG1012C
MSMEG_3124	sufC	FeS assembly ATPase SufC	0,1125	COG0396O
MSMEG_4485	glyS	glycyl-tRNA synthetase	0,1095	COG0423J
MSMEG_2594	asnB	asparagine synthase	0,089	COG0367E
MSMEG_0216	-	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,0825	COG1028IQR
MSMEG_3047	carB	carbamoyl phosphate synthase large subunit	0,0745	COG0458EF
MSMEG_4646	-	pyruvate synthase	0,0705	COG0674C
MSMEG_4700	-	ABC transporter ATP-binding protein	0,0675	COG0488R
MSMEG_4705	-	acyltransferase	0,0675	-
MSMEG_6413	serS	seryl-tRNA synthetase	0,065	COG0172J
MSMEG_5515	purH	bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	0,0635	COG0138F
MSMEG_5404	-	propionate--CoA ligase	0,059	COG0365I
MSMEG_6393	-	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0,054	COG0318IQ
MSMEG_1874	mtrA	DNA-binding response regulator MtrA	0,0525	COG0745TK
MSMEG_1416	-	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	0,052	COG1251C
MSMEG_4185	metH	B12-dependent methionine synthase	0,0455	COG1410E
MSMEG_1179	hutU	urocanate hydratase	0,0435	COG2987E
MSMEG_0732	-	chaperone ClpB	0,0405	COG0542O
MSMEG_4299	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase	0,0325	COG1024I
MSMEG_3143	acnA	aconitate hydratase I	0,0265	COG1048C
MSMEG_5824	purL	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	0,024	COG0046F
MSMEG_5650	-	AMP-dependent synthetase/ligase	0,0205	COG0365I
MSMEG_0131	-	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0,0155	COG0318IQ
MSMEG_6179	-	acetyl-coenzyme A synthetase	0,0085	COG0365I
MSMEG_1680	-	hypothetical protein	0,002	COG3342S

Приложение 2 – Список уникальных белков, идентифицированных в протеомном профиле клеток *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина VarC (wt-pMind-*varC*), но не обнаруженных в протеомном профиле контрольного штамма дикого типа, несущего плазмиду pMind без вставки (wt-pMind). Также предложено распределение данных белков по их метаболическим функциям

Ген	Синоним	Белок	COG
		Биосинтез нуклеотидов	
MSMEG_3044	pyrC	dihydroorotase	COG0044F
MSMEG_4198	pyrD	dihydroorotate dehydrogenase 2	COG0167F
MSMEG_2774	-	diguanylate cyclase	COG2199T
MSMEG_5427	-	ribose-phosphate pyrophosphokinase	COG0462FE
MSMEG_3740	rluB	ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	COG1187J
		Процессинг ДНК	
MSMEG_6587	hrpA	ATP-dependent helicase HrpA	COG1643L
MSMEG_5935	-	ATP-dependent DNA helicase	COG0514L
MSMEG_4912	-	helicase	COG1199KL
MSMEG_6947	dnaA	chromosomal replication initiation protein	COG0593L
MSMEG_4482	dnaG	DNA primase	COG0358L
MSMEG_4694	-	HNH endonuclease	COG1403V
MSMEG_2105	-	ATP dependent DNA ligase	COG3285L
MSMEG_2362	ligA	NAD-dependent DNA ligase LigA	COG0272L
MSMEG_5440	-	deoxyribonuclease	COG0084L
MSMEG_6187	nth	endonuclease III	COG0177L
MSMEG_3061	priA	primosome assembly protein PriA	COG1198L
MSMEG_1580	gcp	DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	COG0533O
MSMEG_5226	xseA	exodeoxyribonuclease VII large subunit	COG1570L
MSMEG_3021	-	recombination factor protein RarA	COG2256L
MSMEG_6938	-	ParB-like partition proteins	COG1475K

MSMEG_6896	-	single-stranded DNA-binding protein	COG0629L
MSMEG_2945	ruvB	Holliday junction DNA helicase RuvB	COG2255L
		Процессинг РНК	
MSMEG_2437	rimM	16S rRNA-processing protein RimM (One of at least 4 proteins (Era, RbfA, RimM and RsgA/YjeQ) that assist in the late assembly stage of the 30S ribosomal subunit.)	COG0806J
MSMEG_1757	-	DEAD/DEAH box helicase	COG1201R
MSMEG_3885	-	DEAD/DEAH box helicase	COG4581L
MSMEG_5042	-	ATP-dependent rna helicase, dead/deah box family protein	COG0513LKJ
MSMEG_6160	-	ATP-dependent rna helicase, dead/deah box family protein	COG1205R
MSMEG_5438	ksgA	dimethyladenosine transferase	COG0030J
MSMEG_4493	era	GTP-binding protein Era (One of at least 4 proteins (Era, RbfA, RimM and RsgA/YjeQ) that assist in the late assembly stage of the 30S ribosomal subunit.)	COG1159R
MSMEG_4901	rph	ribonuclease PH	COG0689J
MSMEG_2778	-	ribonuclease D	COG0349J
MSMEG_3906	-	tRNA (adenine-N(1)-)-methyltransferase	COG2519J
MSMEG_2752	-	RNA polymerase sigma factor SigB	COG0568K
MSMEG_2625	nusA	transcription elongation factor NusA	COG0195K
MSMEG_6073	-	TrmH family RNA methyltransferase	COG0566J
		Процессинг рибосом	
MSMEG_3065	sun	ribosomal RNA small subunit methyltransferase B	COG0144J
MSMEG_2545	-	ribosomal RNA large subunit methyltransferase N	COG0820R
MSMEG_1889	-	ribosome small subunit-dependent GTPase RsgA	COG1162R
MSMEG_1878	-	S30AE family protein	COG1544J
MSMEG_0391	-	Rmt3 protein	-
MSMEG_0387	-	Rmt2 protein	COG4122R
		Регуляция транскрипции	
MSMEG_3488	-	AraC family transcriptional regulator	COG4977K
MSMEG_6219	-	ATPase AAA	COG0714R
MSMEG_6241	-	ATPase AAA	COG0714R

MSMEG_3147	moxR	ATPase, MoxR family protein	COG0714R
MSMEG_2104	-	GntR family transcriptional regulator	COG1167KE
MSMEG_2489	-	GntR family transcriptional regulator	COG1802K
MSMEG_3822	-	GntR family transcriptional regulator	COG2186K
MSMEG_6371	-	GntR family transcriptional regulator	COG1167KE
MSMEG_4505	hrcA	heat-inducible transcription repressor	COG1420K
MSMEG_1901	-	DNA-binding HTH domain-containing protein	COG2197TK
MSMEG_0491	-	LacI family transcriptional regulator	COG1609K
MSMEG_1369	-	LacI family transcriptional regulator	COG1609K
MSMEG_3599	-	LacI family transcriptional regulator	COG1879G
MSMEG_5651	-	LuxR family transcriptional regulator	COG2197TK
MSMEG_0916	-	TetR family transcriptional regulator	COG1309K
MSMEG_4847	-	TetR family transcriptional regulator	COG1309K
MSMEG_5307	-	TetR family transcriptional regulator	COG1309K
MSMEG_6042	-	TetR family transcriptional regulator	COG1309K
MSMEG_2309	-	transcriptional regulatory protein	COG1309K
MSMEG_2179	-	transcriptional regulatory protein	COG1309K
MSMEG_4925	-	transcriptional regulator, Ada family protein/DNA-3-methyladenine glycosylase II	COG0122L
MSMEG_6044	-	ligand-binding /sugar binding domain-containing protein	COG1609K
MSMEG_1060	-	Lsr2 protein	-
MSMEG_6092	-	Lsr2 protein	-
MSMEG_5221	-	N-acetyltransferase GCN5	COG1670J
MSMEG_1970	-	sigma factor	COG3284QK
		Факторы трансляции	
MSMEG_4556	lepA	GTP-binding protein LepA (leader peptidase - elongation)	COG0481M
MSMEG_3793	infC	translation initiation factor IF-3	COG0290J
MSMEG_1849	selB	selenocysteine-specific translation elongation factor	COG3276J
		Аминоацил-тРНК-синтетазы	
MSMEG_4189	cysS	cysteinyl-tRNA synthetase	COG0215J

MSMEG_0952	hemA	glutamyl-tRNA reductase	COG0373H
MSMEG_2383	gltX	glutamyl-tRNA synthetase	COG0008J
MSMEG_3796	lysS	lysyl-tRNA synthetase	COG1190J
MSMEG_3758	tyrS	tyrosyl-tRNA synthetase	COG0162J
MSMEG_3778	pheS	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha	COG0016J
		Рибосомальные белки	
MSMEG_1522	rpsK	30S ribosomal protein S11	COG0100J
MSMEG_1398	rpsL	30S ribosomal protein S12	COG0048J
MSMEG_2435	rpsP	30S ribosomal protein S16	COG0228J
MSMEG_1445	-	30S ribosomal protein S17	COG0186J
MSMEG_6895	rpsR	30S ribosomal protein S18	COG0238J
MSMEG_1440	rpsS	30S ribosomal protein S19	COG0185J
MSMEG_6897	rpsF	30S ribosomal protein S6	COG0360J
MSMEG_1469	rpsH	30S ribosomal protein S8	COG0096J
MSMEG_1346	rplK	50S ribosomal protein L11	COG0080J
MSMEG_1556	rplM	50S ribosomal protein L13	COG0102J
MSMEG_1465	rplN	50S ribosomal protein L14	COG0093J
MSMEG_1474	rplO	50S ribosomal protein L15	COG0200J
MSMEG_1443	rplP	50S ribosomal protein L16	COG0197J
MSMEG_1525	-	50S ribosomal protein L17	COG0203J
MSMEG_2440	rplS	50S ribosomal protein L19	COG0335J
MSMEG_4625	rplU	50S ribosomal protein L21	COG0261J
MSMEG_1441	rplV	50S ribosomal protein L22	COG0091J
MSMEG_1438	rplW	50S ribosomal protein L23	COG0089J
MSMEG_1466	rplX	50S ribosomal protein L24	COG0198J
MSMEG_1470	rplF	50S ribosomal protein L6	COG0097J

MSMEG_6894	rplI	50S ribosomal protein L9	COG0359J
		Нерибосомальный путь синтеза белка	
MSMEG_6137	-	non-ribosomal peptide synthetase	COG1020Q
		Созревание белков	
MSMEG_1485	map	methionine aminopeptidase	COG0024J
MSMEG_2587	map	methionine aminopeptidase	COG0024J
MSMEG_0633	-	PAP2 superfamily protein	COG1597IR
MSMEG_6402	-	PAP2 superfamily protein	COG0671I
		Шапероны	
MSMEG_6318	-	diol dehydratase reactivation protein	COG0849D
MSMEG_0711	dnaJ	molecular chaperone DnaJ	COG0484O
MSMEG_4504	dnaJ	molecular chaperone DnaJ	COG0484O
		Другие факторы фолдинга белков	
MSMEG_2974	-	cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	COG0652O
MSMEG_4671	clpX	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	COG1219O
		Факторы котрансляционной транслокации	
MSMEG_2963	-	extracellular solute-binding protein	COG0747E
MSMEG_4999	-	extracellular solute-binding protein	COG0747E
MSMEG_5130	-	extracellular solute-binding protein	COG0747E
MSMEG_6942	-	inner membrane protein translocase component YidC	COG0706U
MSMEG_2961	secD	preprotein translocase subunit SecD	COG0342U
MSMEG_2962	secF	preprotein translocase subunit SecF	COG0341U
MSMEG_1483	secY	preprotein translocase subunit SecY	COG0201U
MSMEG_2424	ftsY	signal recognition particle-docking protein FtsY	COG0552U
		Деградация белков	
MSMEG_5828	-	aminopeptidase	COG1362E
MSMEG_3894	-	proteasome subunit alpha	COG0638O

MSMEG_4296	-	protease	COG0596R
MSMEG_0083	-	membrane-anchored mycosin mycp1	COG1404O
MSMEG_3476	-	peptidase, M48 family protein	COG0501O
MSMEG_0247	-	secreted peptidase	COG0739M
MSMEG_2579	-	zinc metalloprotease	COG0750M
MSMEG_1854	-	valosin containing protein-1	COG0464O
		Транспорт	
MSMEG_1704	-	ABC transporter	COG4213G
MSMEG_1954	-	ABC transporter	COG0661R
MSMEG_4470	-	ABC transporter	COG1123R
MSMEG_1502	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG1131V
MSMEG_1642	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG1131V
MSMEG_5102	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG0488R
MSMEG_5571	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG3839G
MSMEG_5659	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG1132V
MSMEG_5660	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG1132V
MSMEG_6911	-	ABC transporter ATP-binding protein	COG1126E
MSMEG_3636	-	ABC transporter ferric iron-binding periplasmic protein	COG1840P
MSMEG_1216	-	ABC transporter periplasmic protein	COG0683E
MSMEG_1712	-	ABC transporter periplasmic protein	COG1879G
MSMEG_5059	-	ABC transporter permease	COG0395G
MSMEG_3235	-	amino acid ABC transporter	COG0834ET
MSMEG_6594	-	amino acid ABC transporter permease	COG0765E
MSMEG_6909	-	amino acid ABC transporter permease	COG0765E
MSMEG_2332	-	amino acid carrier protein	COG1115E
MSMEG_6193	-	anion-transporting ATPase	COG0003P

MSMEG_3247	-	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	COG0683E
MSMEG_0763	-	antibiotic transporter	COG2409R
MSMEG_0641	-	binding-protein-dependent transporters inner membrane component	COG0601EP
MSMEG_3231	cydD	cysteine ABC transporter permease/ATP-binding protein	COG4988CO
MSMEG_4354	-	dipeptide-binding protein of ABC transporter	COG0747E
MSMEG_1177	-	cytosine/purines uracil thiamine allantoin permease	COG1457F
MSMEG_1683	-	cytosine/purines uracil thiamine allantoin permease	COG1457F
MSMEG_2726	-	glutamate permease	COG0765E
MSMEG_2728	-	glutamate transport ATP-binding protein GluA	COG1126E
MSMEG_5318	-	glutamine ABC transporter permease/substrate-binding protein	COG0765E
MSMEG_6307	-	glutamine-binding periplasmic protein/glutamine transporter permease	COG0765E
MSMEG_5336	-	amidate substrates transporter protein	-
MSMEG_4182	-	arabinose-proton symporter	COG2814G
MSMEG_3564	bfr	bacterioferritin	COG2193P
MSMEG_6422	-	ferritin family protein	COG1528P
MSMEG_2727	-	glutamate binding protein	COG0834ET
MSMEG_1883	-	glycine betaine transporter OpuD	COG1292M
MSMEG_2926	-	glycine betaine/carnitine/choline transport ATP-binding protein opuCA	COG1125E
MSMEG_1945	-	ion channel membrane protein	COG0569P
MSMEG_6195	-	ion-transporting ATPase	COG0003P
MSMEG_1426	-	membrane sugar transferase	COG1215M
MSMEG_6019	-	sugar ABC transporter ATPase	COG1129G
MSMEG_3269	-	sugar ABC transporter ATP-binding protein	COG3839G
MSMEG_4656	-	sugar ABC transporter ATP-binding protein	COG1129G
MSMEG_6020	-	sugar ABC transporter periplasmic protein	COG4213G
MSMEG_5573	-	sugar ABC transporter permease	COG1175G
MSMEG_4658	-	sugar ABC transporter substrate-binding protein	COG1879G

MSMEG_6804	-	sugar ABC transporter substrate-binding protein	COG1879G
MSMEG_0382	-	transporter	COG2409R
MSMEG_3689	-	sodium:solute symporter	COG0591ER
MSMEG_5303	putP	sodium/proline symporter	COG0591ER
MSMEG_4682	-	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	COG0025P
MSMEG_3281	-	spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	COG3842E
MSMEG_0446	-	putrescine importer	COG1113E
MSMEG_0110	pntA	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	COG3288C
MSMEG_0109	pntB	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	COG1282C
MSMEG_0639	-	oligopeptide transport ATP-binding protein AppF	COG4608E
MSMEG_0640	-	oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	COG0444EP
MSMEG_2319	-	periplasmic binding protein	COG0614P
MSMEG_4560	-	periplasmic binding protein	COG0614P
MSMEG_5779	pstB	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	COG1117P
MSMEG_5636	-	P-type ATPase - metal cation transport	COG0474P
MSMEG_1374	-	ribose ABC transporter periplasmic binding protein	COG1879G
MSMEG_3602	-	ribose transport ATP-binding protein RbsA	COG1129G
MSMEG_4533	-	sulfate-binding protein	COG1613P
MSMEG_0550	-	sulfonate binding protein	COG0715P
MSMEG_6521	-	sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein CysA 2	COG3842E
MSMEG_2116	-	PTS system, glucose-specific IIBC component	COG1263G
		Катаболизм углеводов	
MSMEG_1573	-	carbohydrate kinase	COG0063G
MSMEG_0946	-	NAD dependent epimerase/dehydratase	COG0451MG
MSMEG_3100	opcA	ОрсА protein	COG3429G
MSMEG_0970	-	phosphoglycerate mutase	COG0406G
MSMEG_4712	-	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	COG1071C
MSMEG_4711	-	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	COG0022C
		Цикл Кребса	

MSMEG_4645	orB	2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit beta	COG1013C
MSMEG_2613	mqo	malate:quinone oxidoreductase	COG0579R
MSMEG_1671	-	succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein SdhD	COG2142C
MSMEG_1669	sdhB	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	COG0479C
MSMEG_5912	gabD2	succinate-semialdehyde dehydrogenase	COG1012C
MSMEG_3304	-	succinate semialdehyde dehydrogenase	COG1012C
		Биосинтез углеводов	
MSMEG_3934	-	phosphoenolpyruvate synthase	COG0574G
MSMEG_5968	-	polysaccharide biosynthesis protein	COG2244R
		Промежуточный метаболизм	
MSMEG_2776	dxs	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	COG1154HI
MSMEG_6842	-	2,2-dialkylglycine decarboxylase	COG0160E
MSMEG_6740	-	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	COG2515E
MSMEG_4710	-	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	COG0508C
MSMEG_6082	-	carbonic anhydrase	COG0288P
MSMEG_6098	-	chalcone/stilbene synthase	COG5495S
MSMEG_1568	glmS	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	COG0449M
MSMEG_0417	-	fumarate reductase iron-sulfur subunit	COG0479C
MSMEG_5100	-	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	COG4231C
MSMEG_2529	-	glyoxylate reductase	COG1052CHR
MSMEG_1424	-	FMN-dependent dehydrogenase	COG1304C
MSMEG_5835	-	FAD-binding dehydrogenase	COG3573R
MSMEG_3958	-	glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	-
MSMEG_3076	ggt	gamma-glutamyltransferase	COG0405E
MSMEG_2512	-	lactate 2-monooxygenase	COG1304C
MSMEG_3962	-	lactate 2-monooxygenase	COG1304C
MSMEG_6107	-	limonene 1,2-monooxygenase	COG2141C
MSMEG_6746	-	oxidoreductase, aldo/keto reductase	COG0667C

MSMEG_1009	-	cytochrome p450	COG2124Q
MSMEG_6478	-	cytochrome P450	COG2124Q
MSMEG_0681	-	P450 heme-thiolate protein	COG2124Q
MSMEG_1548	-	propanediol utilization: dehydratase, medium subunit	-
MSMEG_6616	-	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	COG1063ER
MSMEG_5471	galU	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	COG1210M
		Катаболизм липидов	
MSMEG_4248	-	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	COG0204I
MSMEG_5903	fabG	3-ketoacyl-ACP reductase	COG1028IQR
MSMEG_3150	fabG	3-oxoacyl-ACP reductase	COG1028IQR
MSMEG_4254	-	AMP-binding protein	COG1022I
MSMEG_6031	-	carveol dehydrogenase	COG1028IQR
MSMEG_0220	-	monoglyceride lipase	COG2267I
MSMEG_5284	-	patatin	COG1752R
		Биосинтез липидов	
MSMEG_2580	ispG	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	COG0821I
MSMEG_2692	pgsA	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	COG0558I
MSMEG_1920	-	diacylglycerol kinase catalytic subunit	COG1597IR
MSMEG_1604	-	FAD dependent oxidoreductase	COG2303E
MSMEG_1736	-	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	COG0578C
MSMEG_6761	-	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	COG0578C
MSMEG_4703	-	glycerol-3-phosphate acyltransferase	COG2937I
MSMEG_2934	-	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	COG1560M
MSMEG_1140	-	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	COG0240C
MSMEG_4641	-	salicylate hydroxylase	COG0654HC
		Биосинтез жирных кислот	
MSMEG_1204	-	3-oxoacyl-ACP synthase	COG0304IQ
MSMEG_0334	-	acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase subunit alpha	COG4770I

MSMEG_0371	-	MaoC like domain-containing protein	COG2030I
		Биосинтез аминокислот	
MSMEG_3033	aroB	3-dehydroquinate synthase	COG0337E
MSMEG_3285	-	3-isopropylmalate dehydrogenase	COG0473CE
MSMEG_2373	ilvH	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	COG0440E
MSMEG_4258	trpD	anthranilate phosphoribosyltransferase	COG0547E
MSMEG_0688	-	aspartate aminotransferase AspC	COG0436E
MSMEG_6256	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	COG0136E
MSMEG_2664	dapB	dihydrodipicolinate reductase	COG0289E
MSMEG_0877	-	dihydrodipicolinate synthase	COG0329EM
MSMEG_3207	hisB	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	COG0131E
MSMEG_4621	proB	gamma-glutamyl kinase	COG0263E
MSMEG_0949	-	HAD-superfamily hydrolase	COG0560E
MSMEG_3031	aroK	shikimate kinase	COG0703E
MSMEG_4632	-	saccharopine dehydrogenase	COG3268S
MSMEG_3183	ilvA	threonine dehydratase	COG1171E
		Катаболизм аминокислот	
MSMEG_5884	-	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	COG2084I
MSMEG_4538	-	cysteine desulfurase	COG0520E
MSMEG_6471	-	glycine/D-amino acid oxidase	COG0665E
MSMEG_6141	-	N-acyl-D-glutamate amidohydrolase	COG3653Q
MSMEG_5117	-	proline dehydrogenase	COG0506E
MSMEG_3532	-	serine/threonine dehydratase	COG1171E
		Биосинтез порфиринов	
MSMEG_0956	hemB	delta-aminolevulinic acid dehydratase	COG0113H
MSMEG_0954	hemD	uroporphyrinogen-III synthase	COG1587H
		Биосинтез полиаминов	
MSMEG_1072	speB	agmatinase	COG0010E

MSMEG_3535	speB	agmatinase	COG0010E
		Метаболизм кофакторов	
MSMEG_0153	panE	2-dehydropantoate 2-reductase	COG1893H
MSMEG_3054	coaBC	bifunctional phosphopantothenoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase	COG0452H
MSMEG_2616	cobO	cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	COG2109H
MSMEG_5126	fbiC	FO synthase	COG1060HR
MSMEG_2275	hypD	hydrogenase expression/formation protein HypD	COG0409O
MSMEG_2271	hypB	hydrogenase nickel incorporation protein HypB	COG0378OK
MSMEG_6104	folE	GTP cyclohydrolase I	COG0302H
MSMEG_5485	-	molybdopterin biosynthesis protein	COG0521H
MSMEG_4617	nadE	NAD synthetase	COG0171H
MSMEG_1946	nudC	NADH pyrophosphatase	COG2816L
MSMEG_1075	menB	naphthoate synthase	COG0447H
MSMEG_3880	-	nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	-
MSMEG_6097	panC	pantoate--beta-alanine ligase	COG0414H
MSMEG_5252	coaA	pantothenate kinase	COG1072H
MSMEG_6096	-	pantothenate kinase	COG1521K
MSMEG_2937	-	pyridoxal biosynthesis lyase PdxS	COG0214H
MSMEG_3863	-	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	COG3576R
MSMEG_5430	-	retinol dehydrogenase 13	COG1028IQR
MSMEG_3748	-	thiamin pyrophosphokinase catalytic subunit	COG4825S
MSMEG_1115	ubiE	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	COG2226H
		Мембранные белки	
MSMEG_0249	-	integral membrane protein	COG0628R
MSMEG_3234	-	integral membrane protein	COG3247S
MSMEG_4273	-	integral membrane protein	-
MSMEG_4287	-	integral membrane protein	-
MSMEG_6570	-	integral membrane protein	COG3182S
MSMEG_0750	-	membrane protein	COG0586S

MSMEG_5644	-	membrane protein	COG1511S
MSMEG_6386	-	membrane protein	COG4984S
MSMEG_4598	lppH	lipoprotein lppH	-
MSMEG_4537	-	major membrane protein I	-
MSMEG_0959	-	transmembrane protein	-
MSMEG_4484	-	transmembrane protein	COG1512R
MSMEG_5278	-	transmembrane protein	COG4425S
MSMEG_5823	-	transmembrane protein	COG4425S
MSMEG_6400	-	transmembrane protein	-
MSMEG_0381	-	Mmp14a protein	COG2409R
MSMEG_5233	-	RmlD substrate binding domain-containing protein	COG0451MG
		Факторы деления клетки	
MSMEG_2089	ftsE	cell division ATP-binding protein FtsE	COG2884D
MSMEG_6105	-	cell division protein	COG0465O
MSMEG_2090	-	cell division protein FtsX	COG2177D
MSMEG_4236	mraZ	cell division protein MraZ	COG2001S
MSMEG_0061	-	ftsk/SpoIIIE family protein	COG1674D
MSMEG_0062	-	ftsk/SpoIIIE family protein	COG1674D
MSMEG_1679	-	AmiB protein	COG1473R
MSMEG_2521	-	amidase	COG0154J
MSMEG_6939	-	Soj family protein	COG1192D
MSMEG_2690		DNA translocase FtsK	COG1674D
		Биосинтез компонентов клеточной стенки	
MSMEG_1575	alr	alanine racemase	COG0787M
MSMEG_6387	-	arabinosyltransferase A	-
MSMEG_6389	-	arabinosyltransferase A	COG1807M
MSMEG_6388	-	arabinosyltransferase B	COG1807M
MSMEG_6403	-	bifunctional udp-galactofuranosyl transferase glft	COG1216R

MSMEG_6113	dacB	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase	COG2027M
MSMEG_4217	-	DivIVA protein	COG3599D
MSMEG_6382	-	oxidoreductase, FAD-binding	COG0277C
MSMEG_0031	-	penicillin binding protein transpeptidase domain-containing protein	COG0768M
MSMEG_4384	-	penicillin binding protein transpeptidase domain-containing protein	COG0744M
MSMEG_6900	-	penicillin-binding protein 1	COG0744M
MSMEG_5637	-	penicillin-binding protein 4	COG1680V
MSMEG_6201	-	transglycosylase	COG0744M
MSMEG_4490	uppS	UDP pyrophosphate synthase	COG0020I
MSMEG_4227	murG	UDPdiphospho-muramoylpentapeptide beta-N- acetylglucosaminyltransferase	COG0707M
		Сигналинг	
MSMEG_0034	-	FHA domain-containing protein	COG1716T
MSMEG_6130	-	two-component sensor protein	COG4251T
MSMEG_2804	-	two-component system sensor kinase	COG4585T
MSMEG_3239	-	two-component system sensor kinase	COG4585T
MSMEG_4968	-	two-component system sensor kinase	COG4585T
MSMEG_6238	-	two-component system sensor kinase	COG4585T
MSMEG_0030	pknA	serine/threonine protein kinase	COG0515RTKL
MSMEG_0529	-	serine/threonine protein kinase	COG2909K
MSMEG_3677	-	serine/threonine protein kinase	COG0515RTKL
MSMEG_4366	-	serine/threonine protein kinase	COG0515RTKL
MSMEG_0028	-	serine-threonine protein kinase	COG0515RTKL
MSMEG_2410	-	serine-threonine protein kinase	COG1651O
MSMEG_5487	-	sensor histidine kinase	COG0642T
MSMEG_1875	-	sensor histidine kinase MtrB	COG0642T
MSMEG_1637	-	sensor signal transduction histidine kinase	COG0642T
MSMEG_2793	-	sensor-type histidine kinase PrrB	COG0642T
MSMEG_5663	-	sensor-type histidine kinase PrrB	COG0642T

		Белки стрессового ответа	
MSMEG_1411	-	universal stress protein family protein	COG0589T
MSMEG_3811	-	universal stress protein family protein	COG0589T
MSMEG_3945	-	universal stress protein family protein	COG0589T
MSMEG_3950	-	universal stress protein family protein	COG0589T
MSMEG_5733	-	universal stress protein family protein	COG0589T
MSMEG_4497	-	PhoH family protein	COG1702T
MSMEG_0939	-	Ppx/GppA phosphatase	COG0248FP
		Окислительный стресс	
MSMEG_6384	katG	catalase/peroxidase HPI	COG0376P
MSMEG_0835	sodC	copper/zinc superoxide dismutase	COG2032P
MSMEG_0777	-	F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	COG2141C
		Осмотический шок	
MSMEG_5371	ehuA	ectoine/hydroxyectoine ABC transporter ATP-binding protein	COG1126E
MSMEG_5368	ehuB	ectoine/hydroxyectoine ABC transporter solute-binding protein	COG0834ET
		Холодовой шок	
MSMEG_5696	-	cold-shock DNA-binding domain-containing protein	COG1278K
		SOS-ответ	
MSMEG_6080	-	DNA integrity scanning protein DisA	COG1623R
MSMEG_3808	uvrA	excinuclease ABC subunit A	COG0178L
MSMEG_2731	-	DNA repair ATPase	COG1196D
MSMEG_4683	-	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	COG0266L
MSMEG_2419	mutM	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	COG0266L
MSMEG_2740	lexA	LexA repressor	COG1974KT
MSMEG_2723	recA	recombinase A	COG0468L
MSMEG_0003	recF	recombination protein F	COG1195L
		Тепловой шок	
MSMEG_1134	-	heat shock protein HtpX	COG0501O

		Белки ответа на присутствие антибиотиков	
MSMEG_6575	-	beta-lactamase	COG1680V
MSMEG_1006	-	aminoglycoside phosphotransferase	COG3173R
MSMEG_5638	-	metallo-beta-lactamase	COG2220R
MSMEG_0775	-	metallo-beta-lactamase superfamily protein	COG0491R
MSMEG_3667	-	para-nitrobenzyl esterase	COG2272I
MSMEG_4563	-	puromycin N-acetyltransferase	COG3153R
		Транспорт электронов	
MSMEG_0690	-	(Fe-S)-binding protein	COG0247C
MSMEG_0594	-	iron-sulfur cluster binding protein	COG1139C
		Дыхательная цепь	
MSMEG_4268	-	cytochrome C oxidase subunit 2	COG1622C
MSMEG_0974	ccsB	cytochrome C biogenesis protein CcsB	COG0755O
MSMEG_2060	nuoD	NADH dehydrogenase subunit D	COG0649C
MSMEG_2056	nuoH	NADH dehydrogenase subunit H	COG1005C
MSMEG_2054	-	NADH dehydrogenase subunit J	COG0839C
MSMEG_2052	nuoL	NADH dehydrogenase subunit L	COG1009CP
MSMEG_3621	ndh	NADH dehydrogenase	COG1252C
MSMEG_2058	nuoF	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	COG1894C
MSMEG_4263	-	ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	COG1290C
MSMEG_4261	-	ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome C subunit	COG2010C
MSMEG_4262	-	ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	COG0723C
		Энергетический метаболизм	
MSMEG_4939	-	F0F1 ATP synthase subunit delta	COG0712C
MSMEG_4935	atpC	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	COG0355C
MSMEG_4937	atpG	F0F1 ATP synthase subunit gamma	COG0224C
		Регуляторные белки	

MSMEG_0033	-	protein phosphatase 2C	COG0631T
MSMEG_5776	phoU	phosphate transporter regulatory protein PhoU	COG0704P
MSMEG_1284	-	twitching motility protein PilT (VapC toxin)	COG3742S
		Оксидоредуктазы	
MSMEG_0338	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_0406	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_0531	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_1497	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_2080	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_2081	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_3259	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_4715	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_6512	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_1977	-	alcohol dehydrogenase	COG1064R
MSMEG_3375	-	alcohol dehydrogenase	COG2303E
MSMEG_5866	-	alcohol dehydrogenase	COG1062C
MSMEG_3457	-	DoxD family protein/pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	COG1252C
MSMEG_5967	-	glucose-methanol-choline oxidoreductase	COG2303E
MSMEG_0863	-	short chain dehydrogenase	COG1028IQR
MSMEG_1073	-	short chain dehydrogenase	COG0300R
MSMEG_3619	-	short chain dehydrogenase	COG1028IQR
MSMEG_3879	-	short chain dehydrogenase	COG0300R
MSMEG_4188	-	short chain dehydrogenase	COG4221R
MSMEG_4280	-	short chain dehydrogenase	COG0300R
MSMEG_5885	-	short chain dehydrogenase	COG1028IQR
MSMEG_6385	-	short chain dehydrogenase	COG0300R
MSMEG_6916	-	short chain dehydrogenase	COG4221R
MSMEG_3663	-	oxidoreductase	COG0665E

MSMEG_4565	-	oxidoreductase	COG0667C
MSMEG_2377	-	P49 protein	COG1233Q
MSMEG_5053	-	short chain alcohol dehydrogenase	COG4221R
MSMEG_6239	-	1,3-propanediol dehydrogenase	COG1454C
MSMEG_3039	-	monooxygenase	COG0654HC
MSMEG_2038	-	monooxygenase, flavin-binding family protein	COG2072P
MSMEG_2045	-	monooxygenase	COG2141C
MSMEG_3704	-	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	COG1028IQR
		Гидролазы	
MSMEG_1576	-	alpha/beta hydrolase	COG0596R
MSMEG_1655	-	alpha/beta hydrolase	COG0596R
MSMEG_2409	-	alpha/beta hydrolase	COG0657I
MSMEG_2786	-	alpha/beta hydrolase	COG0596R
MSMEG_3508	-	alpha/beta hydrolase	COG0596R
MSMEG_6184	-	alpha/beta hydrolase	COG0596R
MSMEG_2444	-	dienelactone hydrolase	COG0412Q
MSMEG_5236	-	dienelactone hydrolase	COG0412Q
MSMEG_3437	-	esterase	COG0627R
MSMEG_0806	-	hydrolase	COG2234R
MSMEG_2644	-	hydrolase	COG2936R
MSMEG_6906	-	hydrolase	COG0596R
MSMEG_5283	-	hydrolase, CocE/NonD family protein	COG2936R
MSMEG_2936	-	hydrolase, nudix family protein	COG1704S
MSMEG_2390	-	NUDIX family hydrolase	COG0406G
MSMEG_1286	-	sulfatase	COG3119P
MSMEG_6131	-	magnesium or manganese-dependent protein phosphatase	COG2208TK
		Трансферазы	
MSMEG_0830	-	acetyltransferase, gnat family protein	COG0456R

MSMEG_0947	-	acyltransferase	COG0204I
MSMEG_6408	-	acyltransferase	COG0204I
MSMEG_0333	-	carboxyl transferase domain-containing protein	COG4799I
MSMEG_0393	-	Fmt protein	COG2226H
MSMEG_2335	-	hexapeptide transferase	COG0110R
MSMEG_0098	-	methyltransferase	COG2226H
MSMEG_6661	-	O-methyltransferase	COG3315Q
MSMEG_2773	-	RNA methyltransferase	COG2265J
MSMEG_4235	mraW	S-adenosyl-methyltransferase MraW	COG0275M
MSMEG_1050	-	SAM-dependent methyltransferase	COG1041L
MSMEG_1049	-	UbiE/COQ5 family methyltransferase	COG2226H
MSMEG_0367	-	O-demethylpuromycin-O-methyltransferase	COG2813J
		Другое	
MSMEG_5250	-	CalR9 protein	-
MSMEG_5241	-	GAF family protein	COG4585T
MSMEG_0982	-	immunogenic protein	COG2358R
MSMEG_1028	-	geranylgeranyl reductase	COG0644C
MSMEG_0388	tylF	macrocin-O-methyltransferase	-
MSMEG_5898	-	virulence factor Mce family protein	COG1463Q
MSMEG_5181	-	IS1549, transposase	COG5421L
MSMEG_5379	-	IS1096, tnpR protein	-
		Гипотетические белки	
MSMEG_0007	-	hypothetical protein	COG0392S
MSMEG_0023	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0057	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0060	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0067	-	hypothetical protein	COG0455D
MSMEG_0082	-	hypothetical protein	-

MSMEG_0317	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0359	-	hypothetical protein	COG4587R
MSMEG_0562	-	hypothetical protein	COG2354S
MSMEG_0597	-	hypothetical protein	COG3285L
MSMEG_0625	-	hypothetical protein	COG1647R
MSMEG_0632	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0638	-	hypothetical protein	COG0443O
MSMEG_0703	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0736	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0905	pcaC	hypothetical protein	COG2128S
MSMEG_0917	-	hypothetical protein	COG2733S
MSMEG_0923	-	hypothetical protein	COG5373S
MSMEG_0938	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0967	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0987	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1053	-	hypothetical protein	COG1520S
MSMEG_1077	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1189	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1210	-	hypothetical protein	COG1432S
MSMEG_1253	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1260	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1313	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1517	-	hypothetical protein	COG2268S
MSMEG_1567	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1837	-	hypothetical protein	COG0654HC
MSMEG_1938	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1959	-	hypothetical protein	COG1615S
MSMEG_1980	-	hypothetical protein	COG0654HC
MSMEG_1981	-	hypothetical protein	-

MSMEG_2197	-	hypothetical protein	COG1635H
MSMEG_2445	-	hypothetical protein	COG0397S
MSMEG_2589	-	hypothetical protein	COG4954S
MSMEG_2624	-	hypothetical protein	COG0779S
MSMEG_2634	-	hypothetical protein	COG0715P
MSMEG_2695	-	hypothetical protein	COG1842KT
MSMEG_2698	-	hypothetical protein	COG4308Q
MSMEG_2739	-	hypothetical protein	COG5479M
MSMEG_2826	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3020	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3079	-	hypothetical protein	COG1660R
MSMEG_3080	-	hypothetical protein	COG0391S
MSMEG_3107	-	hypothetical protein	COG0189HJ
MSMEG_3148	-	hypothetical protein	COG1721R
MSMEG_3155	-	hypothetical protein	COG0330O
MSMEG_3191	-	hypothetical protein	COG1514J
MSMEG_3204	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3253	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3278	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3459	-	hypothetical protein	COG2966S
MSMEG_3500	-	hypothetical protein	COG3022S
MSMEG_3513	-	hypothetical protein	COG4552R
MSMEG_3570	-	hypothetical protein	COG1289S
MSMEG_3637	-	hypothetical protein	COG1253R
MSMEG_3641	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3645	-	hypothetical protein	COG1259S
MSMEG_3707	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3754	-	hypothetical protein	-
MSMEG_3806	-	hypothetical protein	-

MSMEG_3855	-	hypothetical protein	-
MSMEG_4187	-	hypothetical protein	COG5361S
MSMEG_4252	-	hypothetical protein	-
MSMEG_4282	-	hypothetical protein	-
MSMEG_4284	-	hypothetical protein	COG1090R
MSMEG_4324	-	hypothetical protein	COG2508TQ
MSMEG_4489	-	hypothetical protein	-
MSMEG_4567	-	hypothetical protein	COG1305E
MSMEG_4569	-	hypothetical protein	COG2307S
MSMEG_4570	-	hypothetical protein	COG2308S
MSMEG_4681	-	hypothetical protein	COG5164
MSMEG_4962	-	hypothetical protein	COG0654HC
MSMEG_5048	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5090	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5215	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5246	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5255	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5504	-	hypothetical protein	COG0702MG
MSMEG_5690	-	hypothetical protein	COG3832S
MSMEG_5816	-	hypothetical protein	COG3059S
MSMEG_5830	-	hypothetical protein	COG1659S
MSMEG_5849	-	hypothetical protein	COG4328S
MSMEG_5893	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5902	-	hypothetical protein	COG0767Q
MSMEG_5969	-	hypothetical protein	-
MSMEG_6081	-	hypothetical protein	-
MSMEG_6112	-	hypothetical protein	COG5282S
MSMEG_6202	-	hypothetical protein	COG1408R
MSMEG_6207	-	hypothetical protein	-

MSMEG_6343	-	hypothetical protein	COG0622R
MSMEG_6434	-	hypothetical protein	-
MSMEG_6500	-	hypothetical protein	-
MSMEG_6595	-	hypothetical protein	COG0834ET
MSMEG_6678	-	hypothetical protein	-
MSMEG_6772	-	hypothetical protein	COG2021E
MSMEG_6914	-	hypothetical protein	COG3408G
MSMEG_6929	-	hypothetical protein	COG0728R
MSMEG_3237	-	ATP-binding protein	COG1126E
MSMEG_6593	-	ATP-binding protein	COG1126E
MSMEG_0740	-	glycosyl hydrolase	COG4833G
MSMEG_2349	-	glycosyl hydrolase family protein	COG1543S
MSMEG_0385	-	glycosyl transferase family protein	COG1819GC
MSMEG_0389	-	glycosyl transferase family protein	COG1819GC
MSMEG_0392	-	glycosyl transferase family protein	COG1819GC
MSMEG_3859	-	glycosyl transferase family protein	COG0463M
MSMEG_4535	-	glycoside hydrolase	COG3387G
MSMEG_4253	-	glycoside hydrolase family protein	COG0438M
MSMEG_3132	-	DNA-binding protein	COG1396K
MSMEG_5028	-	HIT family protein	COG0537FGR
MSMEG_6282	-	KanY protein	-
MSMEG_6941	-	R3H domain-containing protein	COG1847R
MSMEG_5068	-	Mrp protein	COG0489D
MSMEG_3662	-	mannose-binding lectin	COG1652S

Приложение 3 – Список уникальных белков, идентифицированных в протеомном профиле клеток *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина VarC (wt-pMind-*varC*), но не обнаруженных в протеомном профиле контрольного штамма дикого типа, несущего плазмиду pMind без вставки (wt-pMind). Также предложено распределение данных белков по их метаболическим функциям

Ген	Синоним	Белок	COG
		Биосинтез нуклеотидов	
MSMEG_0759	purA	adenylosuccinate synthetase	COG0104F
MSMEG_5800	purF	amidophosphoribosyltransferase	COG0034F
MSMEG_1819	purK	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	COG0026F
MSMEG_0766	purT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	COG0027F
MSMEG_5274	purT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	COG0027F
MSMEG_2670	thyA	thymidylate synthase	COG0207F
MSMEG_2683	thyX	FAD-dependent thymidylate synthase	COG1351F
MSMEG_1694	upp	uracil phosphoribosyltransferase	COG0035F
		Процессинг ДНК	
MSMEG_5534	pcrA	ATP-dependent DNA helicase PcrA	COG0210L
MSMEG_3816	uvrB	excinuclease ABC subunit B	COG0556L
MSMEG_1327	recB	exodeoxyribonuclease V subunit beta	COG1074L
MSMEG_4464	-	modulator of DNA gyrase	COG0312R
		Процессинг РНК	
MSMEG_1681	-	endoribonuclease L-PSP superfamily protein	COG0251J
MSMEG_4568	-	ribonuclease Z	COG1234R
MSMEG_4724	-	oligoribonuclease	COG1949A
MSMEG_6926	-	tRNA adenylyltransferase	COG0617J
		Процессинг рибосом	
MSMEG_5222	ychF	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	COG0012J
MSMEG_2541	frr	ribosome recycling factor	COG0233J
		Регуляция транскрипции	

MSMEG_4174	-	IclR family transcriptional regulator	COG1414K
MSMEG_2750	-	iron-dependent repressor IdeR	COG1321K
MSMEG_1963	-	transcriptional regulatory protein	COG3899R
MSMEG_4338	-	transcriptional regulatory protein	COG2226H
MSMEG_2971	-	regulatory protein	COG3835KT
		Факторы трансляции	
MSMEG_2520	tsf	elongation factor Ts	COG0264J
MSMEG_4950	prfA	peptide chain release factor 1	COG0216J
MSMEG_2086	prfB	peptide chain release factor 2	COG1186J
MSMEG_1316	prfC	peptide chain release factor 3	COG4108J
		Аминоацил-тРНК-синтетазы	
MSMEG_4959	argS	arginyl-tRNA synthetase	COG0018J
MSMEG_6074	cysS	cysteinyl-tRNA synthetase	COG0215J
MSMEG_3169	ileS	isoleucyl-tRNA synthetase	COG0060J
MSMEG_5441	metG	methionyl-tRNA synthetase	COG0143J
		Созревание белков	
MSMEG_2273	hypF	[NiFe] hydrogenase maturation protein HypF	COG0068O
MSMEG_4272	-	HesB/YadR/YfhF family protein	COG0316S
		Деградация белков	
MSMEG_5839	-	protease 2	COG1770E
MSMEG_3897	-	proteasome component	-
MSMEG_0234	-	metallopeptidase	COG3590O
MSMEG_0899	-	prolyl oligopeptidase	COG1505E
		Транспорт	
MSMEG_3768	-	macrolide ABC transporter ATP-binding protein	COG0488R
MSMEG_0088	ptsI	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	COG1080G
		Метаболизм глицерола	
MSMEG_3271	-	dihydroxyacetone kinase	COG2376G

MSMEG_1547	-	glycerol dehydratase large subunit	COG4909Q
MSMEG_6229	glpK	glycerol kinase	COG0554C
		Гликолиз	
MSMEG_0935	-	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	COG0588G
MSMEG_3507	-	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	COG3588G
MSMEG_3086	tpiA	triosephosphate isomerase	COG0149G
		Пентозофосфатный путь	
MSMEG_3632	gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase	COG0362G
MSMEG_3102	tal	transaldolase	COG0176G
MSMEG_2467	-	transketolase, central region	COG0022C
		Другие ферменты катаболизма углеводов	
MSMEG_4916	-	alpha-amylase	COG0366G
MSMEG_5576	-	D-mannonate oxidoreductase	COG0246G
MSMEG_1376	-	xylulose kinase	COG1070G
		Цикл Кребса	
MSMEG_5524	sucD	succinyl-CoA synthetase subunit alpha	COG0074C
		Биосинтез углеводов	
MSMEG_1825	rfbD	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	COG1091M
MSMEG_0384	rfbA	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	COG1209M
MSMEG_4918	glgB	glycogen branching protein	COG0296G
MSMEG_3184	treZ	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	COG0296G
MSMEG_0255	-	phosphoenolpyruvate carboxykinase	COG1274C
MSMEG_1834	manB	phosphomannomutase	COG1109G
MSMEG_6514	-	trehalose synthase-fused maltokinase	COG3281G
		Промежуточный метаболизм	
MSMEG_6645	-	2-methylcitrate dehydratase	COG2079R
MSMEG_5055	-	NAD-dependent malic enzyme	COG0281C
MSMEG_0783	pta	phosphate acetyltransferase	COG0280C

MSMEG_0665	-	sarcosine oxidase subunit beta	COG0665E
MSMEG_1635	-	nitroreductase	COG0778C
MSMEG_4713	-	HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase	COG2301G
MSMEG_2007	-	HpcE protein	COG0179Q
MSMEG_5735	-	indole-3-pyruvate decarboxylase	COG3961GHR
MSMEG_4340	-	NAD/mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase	COG1062C
		Катаболизм липидов	
MSMEG_3515	-	3-alpha-(or 20-beta)-hydroxysteroid dehydrogenase	COG1028IQR
MSMEG_6791	-	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	COG1250I
MSMEG_1496	mmsB	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	COG2084I
MSMEG_0409	-	condensation domain-containing protein	-
		Катаболизм жирных кислот	
MSMEG_5199	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG0183I
MSMEG_6041	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_6585	-	acyl-CoA dehydrogenase	COG1960I
MSMEG_2938	tesB	acyl-CoA thioesterase	COG1946I
MSMEG_5198	-	carnitiny-CoA dehydratase	COG1024I
MSMEG_3139	-	enoyl-CoA hydratase	COG1024I
MSMEG_4077	-	enoyl-CoA hydratase	COG1024I
MSMEG_5277	-	enoyl-CoA hydratase	COG1024I
MSMEG_5639	-	enoyl-CoA hydratase	COG1024I
MSMEG_6353	-	enoyl-CoA hydratase	COG1024I
MSMEG_4325	-	malonyl CoA-ACP transacylase	COG0331I
MSMEG_6008	-	acetyl-CoA acetyltransferase	COG0183I
		Биосинтез жирных кислот	
MSMEG_5642	-	acetyl-coenzyme a carboxylase carboxyl transferase	COG0777I
MSMEG_4326	acpP	acyl carrier protein	COG0236IQ
MSMEG_5248	-	acyl-[ACP] desaturase	-
MSMEG_0909	-	acyl-ACP thioesterase	COG3884I

MSMEG_0304	-	acyl-CoA synthetase	COG0318IQ
MSMEG_1982	-	acyl-CoA synthetase	COG0318IQ
MSMEG_3687	-	acyl-CoA synthetase	COG0318IQ
MSMEG_5114	-	acyl-CoA synthetase	COG0318IQ
MSMEG_5914	-	acyl-CoA synthetase	COG0318IQ
MSMEG_6002	-	coenzyme A transferase subunit A	COG1788I
MSMEG_4112	-	cyclohexanecarboxylate-CoA ligase	COG0318IQ
MSMEG_3465	-	fatty-acid--CoA ligase	COG0318IQ
MSMEG_4301	-	fatty-acid--CoA ligase	COG0318IQ
MSMEG_0257	-	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	COG0318IQ
MSMEG_5291	-	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	COG0318IQ
MSMEG_6754	-	MaoC like domain-containing protein	COG2030I
		Биосинтез аминокислот	
MSMEG_1890	aroA	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	COG0128E
MSMEG_6638	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate/homocysteine S-methyltransferase	COG0620E
MSMEG_6351	hisC	aminotransferase	COG0079E
MSMEG_3217	trpE	anthranilate synthase component I	COG0147EH
MSMEG_3770	argG	argininosuccinate synthase	COG0137E
MSMEG_5265	-	cystathionine gamma-synthase	COG0626E
MSMEG_4905	cysM	cysteine synthase B	COG0031E
MSMEG_4958	lysA	diaminopimelate decarboxylase	COG0019E
MSMEG_2684	dapA	dihydrodipicolinate synthase	COG0329EM
MSMEG_0894	-	dihydrodipicolinate reductase	COG4091E
MSMEG_4955	thrB	homoserine kinase	COG0083E
MSMEG_6271	leuA	2-isopropylmalate synthase	COG0119E
MSMEG_6418	-	prephenate dehydratase	COG0077E
MSMEG_6330	-	prephenate dehydrogenase	COG0287E

MSMEG_3221	trpA	tryptophan synthase subunit alpha	COG0159E
MSMEG_3309	-	tryptophan synthase subunit beta	COG1350R
MSMEG_0990	mtaP	5'-methylthioadenosine phosphorylase	COG0005F
MSMEG_5104	-	tetrahydropicolinate succinylase	COG2171E
		Катаболизм аминокислот	
MSMEG_5276	-	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	COG1024I
MSMEG_5448	arcA	arginine deiminase	COG2235E
MSMEG_6286	-	aspartate transaminase	COG1167KE
MSMEG_3786	-	D-amino acid deaminase	COG3616E
MSMEG_2252	-	flavin-type hydroxylase	COG0654HC
MSMEG_4278	gcvT	glycine cleavage system aminomethyltransferase T	COG0404E
MSMEG_1182	hutI	imidazolonepropionase	COG1228Q
MSMEG_1181	hutF	N-formimino-L-glutamate deiminase	COG0402FR
MSMEG_3772	argF	ornithine carbamoyltransferase	COG0078E
		Биосинтез порфиринов	
MSMEG_2615	-	chelataase	COG1239H
MSMEG_2781	hemG	protoporphyrinogen oxidase	COG1232H
		Метаболизм кофакторов	
MSMEG_2408	-	2,5-diketo-D-gluconate reductase A	COG0656R
MSMEG_1109	-	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase	COG1165H
MSMEG_5795	-	4-amino-4-deoxychorismate lyase	COG0115EH
MSMEG_4934	-	ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase	COG2096S
MSMEG_2738	-	biotin sulfoxide reductase	COG0243C
MSMEG_3864	cobN	cobaltochelataase subunit CobN	COG1429H
MSMEG_2617	cobB	cobyrinic acid a,c-diamide synthase	COG1797H

MSMEG_1242	iscS	cysteine desulfurase IscS	COG1104E
MSMEG_3200	nadB	L-aspartate oxidase	COG0029H
MSMEG_0862	-	molybdopterin biosynthesis protein MoeA	COG0303H
MSMEG_4911	pncB	nicotinate phosphoribosyltransferase	COG1488H
MSMEG_5667	-	phytoene dehydrogenase	COG1233Q
MSMEG_6519	-	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	COG0748P
MSMEG_2618	cobA	uroporphyrin-III C-methyltransferase	COG0007H
		Факторы деления клетки	
MSMEG_0858	-	cell division control protein Cdc48	COG0464O
		Биосинтез компонентов клеточной стенки	
MSMEG_5426	glmU	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase/glucosamine-1-phosphate acetyltransferase	COG1207M
MSMEG_1559	glmM	phosphoglucosamine mutase	COG1109G
MSMEG_6404	glf	UDP-galactopyranose mutase	COG0562M
MSMEG_4226	murC	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	COG0773M
MSMEG_4231	-	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	COG0770M
		Сигналинг	
MSMEG_2196	-	sensory box/response regulator	COG5001T
		Белки стрессового ответа	
MSMEG_6142	-	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	COG0451MG
MSMEG_3479	tpx	thiol peroxidase	COG2077O
MSMEG_6933	trxB	thioredoxin-disulfide reductase	COG0492O
MSMEG_2658	-	beta-lactamase	COG2367V
MSMEG_5385	-	metallo-beta-lactamase	COG0491R
MSMEG_6235	-	thiopurine S-methyltransferase (tpmt) superfamily protein	COG2227H
MSMEG_6636	-	[Mn] superoxide dismutase	COG0605P
		Транспорт электронов	
MSMEG_0734	-	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	COG4638PR

MSMEG_6410	-	Rieske 2Fe-2S family protein	COG2220R
		Оксидоредуктазы	
MSMEG_4742	-	clavaldehyde dehydrogenase	COG4221R
MSMEG_0309	-	aldehyde dehydrogenase	COG1012C
MSMEG_0684	-	aldehyde oxidase	COG1529C
MSMEG_2317	-	alcohol dehydrogenase	COG1064R
MSMEG_0746	-	carbon-monoxide dehydrogenase, large subunit	COG1529C
MSMEG_5681	-	ferredoxin/ferredoxin--NADP reductase	COG0493ER
MSMEG_6907	-	MmcI protein	COG2141C
MSMEG_1291	-	oxidoreductase	COG1529C
MSMEG_2516	-	oxidoreductase	COG2141C
MSMEG_4650	-	oxidoreductase YisS	COG0673R
MSMEG_0301	-	oxidoreductase, FAD-binding	COG0277C
MSMEG_5037	-	oxidoreductase, FAD-binding	COG0277C
MSMEG_2611	-	mycothione reductase	COG1249C
MSMEG_0702	-	monooxygenase	COG2141C
MSMEG_1291	-	oxidoreductase	COG1529C
MSMEG_2026	-	short chain dehydrogenase	COG0300R
MSMEG_5999	-	short chain dehydrogenase	COG1028IQR
MSMEG_1760	-	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	COG4221R
MSMEG_2019	-	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	COG4221R
MSMEG_6134	-	NADP-dependent fatty aldehyde dehydrogenase	COG1012C
		Гидролазы	
MSMEG_1090	-	amidase	COG0154J
MSMEG_0883	-	amidohydrolase	COG3653Q
MSMEG_1702	-	amidohydrolase	COG1473R
MSMEG_3861	-	amidohydrolase	COG1574R
MSMEG_5454	-	choloylglycine hydrolase	COG3049M
MSMEG_3810	-	hydrolase	COG0491R

MSMEG_4126	-	hydrolase, isochorismatase	COG1335Q
MSMEG_4379	-	isochorismatase hydrolase	COG1335Q
MSMEG_4976	-	isochorismatase hydrolase	COG1335Q
MSMEG_3625	ureC	urease subunit alpha	COG0804E
MSMEG_0760	-	thioesterase	COG2050Q
MSMEG_2929	-	thioesterase	COG2050Q
		Трансферазы	
MSMEG_0422	-	transferase	COG2513G
MSMEG_4303	-	methyltransferase	COG0492O
MSMEG_1809	-	thiosulfate sulfurtransferase	COG2897P
MSMEG_2593	-	GNAT family acetyltransferase	COG1181M
MSMEG_3846	-	phosphotransferase enzyme family protein	COG3173R
		Другое	
MSMEG_0224	-	O-methyltransferase MdmC	COG4122R
MSMEG_0919	-	heparin-binding hemagglutinin	COG0188L
MSMEG_0076	-	antigen MTB48	COG5651N
MSMEG_4463	-	CalR5 protein	COG0312R
MSMEG_3512	-	competence damage-inducible protein A	COG1058R
MSMEG_1903	-	caib/baif family protein	COG1804C
MSMEG_2073	-	CAIB/BAIF family protein	COG1804C
MSMEG_3787	-	D-aminoacylase	COG3653Q
MSMEG_5044	-	ATPase	COG2251R
MSMEG_4075	-	CoA-binding protein	COG1042C
MSMEG_3468	-	AMP-binding protein	COG0318IQ
MSMEG_5649	-	AMP-binding protein	COG0318IQ
		Гипотетические белки	
MSMEG_0044	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0045	-	hypothetical protein	-

MSMEG_0337	-	hypothetical protein	-
MSMEG_0365	-	hypothetical protein	COG4842S
MSMEG_0897	-	hypothetical protein	COG3395S
MSMEG_1265	-	hypothetical protein	-
MSMEG_1513	-	hypothetical protein	COG2141C
MSMEG_1891	-	hypothetical protein	COG2135S
MSMEG_2417	-	hypothetical protein	COG1399R
MSMEG_3471	-	hypothetical protein	COG0807H
MSMEG_3574	-	hypothetical protein	COG4783R
MSMEG_3620	-	hypothetical protein	COG2141C
MSMEG_3657	-	hypothetical protein	COG1053C
MSMEG_3799	-	hypothetical protein	-
MSMEG_4124	-	hypothetical protein	COG2079R
MSMEG_4200	-	hypothetical protein	COG0624E
MSMEG_4348	-	hypothetical protein	COG0028EH
MSMEG_4755	-	hypothetical protein	COG0624E
MSMEG_5089	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5259	-	hypothetical protein	COG1331O
MSMEG_5490	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5560	-	hypothetical protein	-
MSMEG_5586	-	hypothetical protein	COG3804S
MSMEG_5664	-	hypothetical protein	COG0545O
MSMEG_6215	-	hypothetical protein	COG2968S
MSMEG_6234	-	hypothetical protein	-
MSMEG_6329	-	hypothetical protein	COG3554S
MSMEG_6499	-	hypothetical protein	COG2343S
MSMEG_6565	-	hypothetical protein	COG0188L
MSMEG_6921	-	hypothetical protein	COG1678K