

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.24-002.5-002.5[576.8:579.716.5]

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-1-42-57>

Поступила в редакцию 19.09.2022

Received 19.09.2022

**В. В. Слипень, Л. К. Суркова, Г. Л. Гуревич***Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии,  
Минск, Республика Беларусь***ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ PE\_PGRS И СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК,  
РЕПЛИКАЦИИ И РЕКОМБИНАЦИЙ У MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**Аннотация.** Изучение изменчивости генов PE и PPE, а также системы репарации ДНК, репликации и рекомбинаций позволяет оценить механизмы эволюции и адаптации *Mycobacterium tuberculosis*.

Цель работы – изучить изменчивость генов PE\_PGRS, 3R-системы (репарации ДНК, репликации и рекомбинаций) для оценки механизмов эволюционных изменений *M. tuberculosis*.

Проведено полногеномное секвенирование штаммов *M. tuberculosis* 11502 и *M. tuberculosis* 5005 (относились к генотипу *Beijing*), а также *M. tuberculosis* 4860 (генотип *LAM*), выделенных от пациентов с впервые диагностированным туберкулезом легких. Геномы загружены в международный банк геномов GenBank, NCBI: *M. tuberculosis* 11502 (код доступа CP070338.1), *M. tuberculosis* 5005 (код доступа CP053092.1), *M. tuberculosis* 4860 (код доступа CP049108.1). Секвенированные геномы сравнивали со стандартным референтным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank, NCBI: NC\_000962.3). В геноме *M. tuberculosis* 11502, относящихся к генотипу *Beijing*, подтипу B0/W148, кластеру 100-32, выявлены мутации в 44,4 ± 6,8 % генов (в 24 из 54), относящихся к 3R-системе, в то время как у *M. tuberculosis* 4860, относящихся к генотипу *LAM*, меньшее количество генов из системы 3R было подвержено мутациям: 29,6 ± 6,2 % (16 генов из 54). В генах 3R-системы установлен незначительный сдвиг мутаций в сторону замены на аденин и тимин, в то время как для всего генома *M. tuberculosis* 11502 (в сравнении с *M. tuberculosis* H37Rv) характерно накопление G + C. Появление мутаций в генах 3R-системы может сопровождаться субоптимальной активностью белков, ответственных за репарацию, что может приводить к увеличению частоты и спектра спонтанных мутаций. Анализ генов PE\_PGRS в геноме *M. tuberculosis* 11502, 4860, 5005 показал, что их вариабельность варьировалась у разных представителей этого семейства генов. Было установлено высокое содержание тетрауклеотидов CGGC в большинстве генов семейства PE\_PGRS, где доля CGGC варьировалась от 2,11 до 8,42 %, в то время как в среднем в геноме *M. tuberculosis* их доля составляла 1,62 %. Установлено, что в некоторых генах генома *M. tuberculosis* комбинация тетрауклеотидов CGGC вообще не встречается (Rv0011, Rv0100, Rv0460, Rv0616A, Rv0691A, Rv0722, Rv0863, Rv0909, Rv1038c, Rv1197, Rv2347c, Rv2452c, Rv3053c, Rv3320c). Конформационный анализ ДНК в местах мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным лекарственным средствам, показал, что формирование вторичных структур ДНК происходит преимущественно за счет комбинаций нуклеотидов CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC, а мутации в генах возникают, как правило, в местах формирования вторичных структур ДНК (шпилек), в которых может происходить перераспределение энергии взаимодействий, зарядов, и, как следствие, могут возникать ошибки репликации и мутации. Возникновение события мутации зависит еще и от других факторов, которые могут нейтрализовать возникающие энергетические изменения в ДНК, а также влияют на точность процесса репликации, репарации (мутации в *gyrA* гене, в генах 3R-системы).

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, полиморфизм единичных нуклеотидов, гены системы репарации ДНК, репликации, рекомбинаций, изменчивость PE\_PGRS генов

**Для цитирования:** Слипень, В. В. Изменчивость генов PE\_PGRS и системы репарации ДНК, репликации и рекомбинаций у *Mycobacterium tuberculosis* / В. В. Слипень, Л. К. Суркова, Г. Л. Гуревич // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2023. – Т. 20, № 1. – С. 42–57. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-1-42-57>

**Veronika V. Slizen, Larissa K. Surkova, Gennady L. Gurevich***Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry, Minsk, Republic of Belarus***VARIABILITY ASSESSMENT OF PE\_PGRS GENES AND DNA REPAIR, REPLICATION,  
AND RECOMBINATION GENES IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**Abstract.** The variability assessment of PE/PPE genes, as well as of DNA repair, replication, and recombination system genes may drive the concept of mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* evolution and adaptation.

The aim is to study the variability of PE\_PGRS genes, 3R-system genes (DNA repair, recombination, and replication) to assess the mechanisms of evolutionary changes in *M. tuberculosis*.

Whole genome sequencing of *M. tuberculosis* 11502 (the Beijing genotype subtype B0/W148 cluster 100-32), *M. tuberculosis* 5005 (the Beijing genotype subtype B0/W148), *M. tuberculosis* 4860 (the LAM genotype) strains was performed. They

were isolated from patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. Genomes were uploaded to the GenBank, NCBI: *M. tuberculosis* H37Rv – access code: CP070338.1, *M. tuberculosis* 5005 – access code: CP053092.1, *M. tuberculosis* 4860 – access code: CP049108.1. A reference genome (*M. tuberculosis* H37Rv; NC\_000962.3) was used for genetic analysis. In the *M. tuberculosis* H37Rv genome, 44.4 ± 6.8 % of genes (24 genes out of 54) were revealed in the mutations related to the 3R system, while in *M. tuberculosis* 4860 – 29.6 ± 6.2 % (16 genes out of 54). In the 3R system genes, a slight shift of mutations towards replacement by adenine and thymine was revealed, while the entire genome of *M. tuberculosis* H37Rv (compared to *M. tuberculosis* 4860) demonstrated mutations, resulting in a slight accumulation of G + C. Mutations in the 3R system genes may lead to the suboptimal activity of proteins responsible for the DNA-repair, resulting in the upsurge of mutation frequency and promoting adaptive evolution. PE\_PGRS genes in the genome of *M. tuberculosis* H37Rv, 4860, and 5005 exhibited a high variability and their variability diverged among different members of this gene family. A high level of tetranucleotides CGGC was found in the majority of PE\_PGRS family genes, where their proportion varied from 2.11 to 8.42 %, while an average proportion of CGGC in the *M. tuberculosis* genome was 1.62 %. Some genes in the *M. tuberculosis* genome were detected to carry no tetranucleotides CGGC (Rv0011, Rv0100, Rv0460, Rv0616A, Rv0691A, Rv0722, Rv0863, Rv0909, Rv1038c, Rv1197, Rv2347c, Rv2452c, and Rv3330c). The DNA conformation analysis at the mutation sites in the genes, associated with resistance to anti-tuberculosis drugs, showed that the secondary DNA structures were mainly formed by nucleotides CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC, and mutations occurred, predominantly, at the sites of forming secondary DNA structures (hairpins) where the redistribution of energy and charges can influence the accuracy of replication and result in replication errors and a mutation event. A number of additional factors can influence the probability of a mutation event. These are the factors that can neutralize the energy changes in the DNA secondary structures, and can affect the accuracy of DNA-repair and replication (mutations in the *gyrA* gene, in the 3R-system genes).

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, single nucleotide polymorphism, genes of the DNA repair, replication, and recombination system, variability of PE\_PGRS genes

**For citation:** Slizen V. V., Surkova L. K., Gurevich G. L. Variability assessment of PE\_PGRS genes and DNA repair, replication, and recombination genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 1, pp. 42–57 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-1-42-57>

**Введение.** С целью снижения к 2050 г. заболеваемости туберкулезом до 1 случая на 1 000 000 и элиминации туберкулеза как медицинской проблемы необходимо преодолеть определенные трудности, во многом обусловленные изменчивостью и клональностью *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) и их высокими адаптационными возможностями [1–3]. Применение методов сравнительной геномики к анализу геномов прокариот позволило определить, что наряду с сокращением генетического материала, приводящим к уменьшению генома, доминирующей силой эволюции прокариот является горизонтальный перенос генов. Важнейшим компонентом прокариотического мира является мобилом – огромная коллекция вирусов, плазмид и других самореплицирующихся элементов, обеспечивающих постоянный обмен между стабильными хромосомами и служащих движущей силой горизонтального обмена [4]. Современная эволюция генома МБТ отличается отсутствием латерального генетического переноса, тем не менее они генетически неоднородны (формируют клональные группы – кластеры, генотипы), а кроме того, у МБТ есть мутации, специфичные для этого вида, подтипов, кластерных групп [5]. Из-за отсутствия генетических рекомбинаций и горизонтального переноса генов у МБТ мутационная изменчивость является важным механизмом адаптации к меняющимся условиям среды [6]. Изучение мутационной изменчивости МБТ как одного из механизмов их эволюции является актуальным. Филогенетический анализ с использованием синонимичных и несинонимичных мутаций позволяет получать важную клиническую, эпидемиологическую и эволюционную информацию [7]. Миссенс-мутации в генах систем репарации могут сопровождаться неточной репарацией и сохранением мутаций, что позволяет обеспечивать адаптационную изменчивость МБТ, в том числе устойчивость к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС) [8], что также обуславливает необходимость изучения локусов генома МБТ, вовлеченных в репарацию. Гены репарации ДНК у микобактерий туберкулезного комплекса обладают более высоким полиморфизмом, чем гены «домашнего хозяйства» [9, 10].

Анализ впервые секвенированного генома МБТ H37Rv [11] позволил выявить уникальные для МБТ белки – PE и PPE, содержание глицина в которых может достигать 50 % за счет присутствия многочисленных тандемных повторов Gly–Gly–Ala или Gly–Gly–Asn [11]. Белки PE и PPE проявляют антигенные свойства, локализуются в клеточной мембране или секретируются наружу. Их экспрессия варьируется в процессе инфекции. Гены белков PE и PPE проявляют изменчивость за счет делеций и дупликаций тандемных повторов, используя механизмы проскальзыва-

ния вилки репликации. Возникающие антигенные вариации PE и PPE белков позволяют им ускользать от действия иммунной системы [11]. Изучение изменчивости генов PE и PPE позволит изучить механизмы эволюции и адаптации МБТ.

Высокопроизводительное секвенирование нового поколения обеспечивает доступ ко всем областям хромосомы, что делает доступным анализ мутационных изменений во всех областях генома, а следовательно, и изучение эпидемиологии туберкулеза, популяционной биологии, эволюции микобактерий [10–13].

Цель работы – изучить изменчивость генов PE/PPE, 3R-системы (репарации ДНК, рекомбинации и репликации) для оценки механизмов эволюционных изменений *Mycobacterium tuberculosis*.

**Материалы и методы исследования.** Исследован штамм МБТ с лабораторным номером 11502, относящийся к пре-ШЛУ и выделенный из мокроты от пациента (мужчины) с впервые диагностированным туберкулезом легких. Выделение, идентификация, определение устойчивости МБТ к ПТЛС проводилось в соответствии с «Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза» (приказ МЗ РБ от 22.03.2013 г. № 377). Информация об исследуемом штамме МБТ 11502 была загружена в международный банк данных о биологическом образце (код доступа в NCBI: SAMN17832565).

**Высокопроизводительное секвенирование нового поколения полного генома.** Выделение ДНК проводили с помощью набора QIAGEN Blood Cell Culture DNA MaxiKit (CatNo./ID: 13362) либо QIAamp DNA MiniKit (Cat No./ID: 51304) согласно прилагающейся инструкции. Для секвенирования ДНК (в концентрации 1 нг/мкл) использовали приборы MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore, с ячейкой R 9.4.1). Все этапы подготовки библиотек ДНК выполняли в соответствии с инструкцией фирмы, производящей наборы реактивов Nextera XT DNA Library Preparation Kit (FC – 131-1024, Illumina) и Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109, Oxford Nanopore). Для сортировки полученных прочтений с помощью секвенатора MinION применяли программу Varapost v. 2020-11-16. Сборку осуществляли с использованием программ Flye v. 2.8.2; SPAdes v. 3.14.1, покрытие генома – 560.0x. Для оценки удельного веса нуклеотидов (A, T, G, C), кодонов в структуре генома применяли программу codon usage ([https://www.cmbi.uga.edu/software/codon\\_usage.html](https://www.cmbi.uga.edu/software/codon_usage.html)). Генные мутации определяли с помощью программы MAUVE (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>). Выравнивание геномов и их сравнительный анализ проводили с использованием MSA Viewer, BLAST, NCBI. С помощью программы Unipro Ugen определяли количество и состав tandemных повторов в 24 MIRU-VNTR локусах.

Для сравнения генетических свойств микобактерий кроме МБТ 11502 (код доступа GenBank, NCBI – CP070338.1) использовали ранее секвенированные штаммы МБТ 4860 (код доступа GenBank, NCBI – CP049108.1) и МБТ 5005 (код доступа GenBank, NCBI – CP053092.1), а также стандартный референтный штамм из GenBank, NCBI – МБТ H37Rv (код доступа – NC\_000962.3).

**Результаты и их обсуждение. Изменчивость генов системы репарации ДНК, рекомбинации и репликации (3R-системы).** Геном МБТ считается относительно стабильным. Накопление данных полногеномного секвенирования МБТ и анализ генов 3R-системы, ответственных за эволюцию второго порядка, позволил сделать заключение о существенно большем полиморфизме в этой функциональной группе генов по сравнению с конститутивными генами «домашнего хозяйства» [9, 10]. Анализ гомологии генов *E. coli* и МБТ позволил идентифицировать гены NER, отвечающие за эксцизионную репарацию нуклеотидов, гомологичную рекомбинацию, негомологичную рекомбинацию (NHEJ), SOS-репарацию, эксцизионную репарацию оснований (BER), мутагенез, в то время как гены, отвечающие за восстановление нуклеотидных замен (MMR), не были выявлены у МБТ. Фермент нуклеаза-хеликаза RecBCD, описанный у *E. coli*, присутствует и у МБТ и отвечает за путь одноцепочечного (single-strand annealing pathway (SSA)) отжига [14, 15]. Гены 3R-системы могут играть важную роль в эволюции высококлональных микроорганизмов. Полиморфизм единичных нуклеотидов (ПЕН) в генах 3R-системы можно использовать также для филогенетического анализа микобактерий туберкулезного комплекса [9, 10]. Функции белков, кодируемых генами 3R-системы, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Функции некоторых компонентов системы репарации, рекомбинации, репликации у *M. tuberculosis* [14–17]Table 1. Function of some components of the repair, recombination, and replication system in *M. tuberculosis* [14–17]

Белок	Ген	Функция	Белок	Ген	Функция
<i>Экцизионная репарация нуклеотидов (NER)</i>					
UvrD2	<i>Rv3198c</i>	Невыраженная хеликазная активность, роль не установлена	UvrC	<i>Rv1420</i>	Обладает активностью расщепления нуклеотидов, управляемая UvrA2B
UvrD1	<i>Rv0949</i>	Хеликазная активность; замещение ДНК, расщепленной <i>uvrabc</i>	UvrB	<i>Rv1633</i>	В комплексе с димером UvrA сканирует ДНК на наличие ошибок
UvrA	<i>Rv1638</i>	ДНК-зависимая АТФ-азная активность, димер связывается с ДНК и регулирует связывание UvrB			
<i>NER-система</i>					
Mfd/trcF	<i>Rv1020</i>	Транскрипционный фактор сопряжения репарации транскрипции (TRCF)			
<i>Экцизионная репарация оснований (BER): ферменты для «дезинфекции» пула нуклеотидов</i>					
MutT4	<i>Rv3908</i>	Плохо охарактеризована	Dut	<i>Rv2697c</i>	Имеет активность дУТФ-азы и дЦТФ-азы
MutT2	<i>Rv1160</i>	Гидролизует дЦТФ, 5-метил ЦТФ, 8-оксо-ГТФ	MutT3	<i>Rv0413</i>	Гидролизует дАТФ, плохо охарактеризована
MutT1	<i>Rv2985</i>	Гидролизует ряд поврежденных нуклеотидов 8-оксо-Г, Ар4А, Ар5А, Ар6А			
<i>BER и окисленные основания</i>					
Nei	<i>Rv3297</i>	Действует на окисленные пиримидины; совместно с <i>Nth</i> проводит репарацию 8-оксо-Г, инкорпорированного против А или Г	Nth	<i>Rv3674c</i>	Эндонуклеаза III; действует на окисленные пиримидины, совместно с <i>Nei</i> репарирует остатки 8-оксо-Г, инкорпорированные против Г
<i>BER и репарации алкилирующих поврежденных оснований</i>					
TagA	<i>Rv1210</i>	3-Метиладенин гликозилаза I, продуцируется конститутивно, высокоспецифична	Mpg	<i>Rv1688</i>	3-Метилпурин-ДНК-гликозилаза, восстанавливает поврежденные дезаминированием пуринов основания в дуплексе ДНК
Ogt (adaB)	<i>Rv1316c</i>	О <sup>6</sup> -Алкил-гуанин ДНК алкил-трансфераза II	AlkA (ada)	<i>Rv1317c</i>	3-Метиладенин гликозилаза II – фермент адаптивного ответа, контролируемого геном <i>ada</i>
<i>AP-эндонуклеазы</i>					
XthA End/Nfo	<i>Rv0427c</i> <i>Rv0670</i>	Действуют в местах напротив цитозина			
<i>ДНК-полимеразы</i>					
PolA	<i>Rv1629</i>	ДНК-полимераза I	DnaZX	<i>Rv3711c</i>	Кодируют $\gamma$ , $\epsilon$ и $\beta$ -субъединицы полимеразы III; склонна к ошибкам полимеризации
–	<i>Rv3644c</i>	Кодирует ДНК-полимеразу или хеликазу	DnaQ DnaN	<i>Rv3721c</i> <i>Rv0002</i>	
DnaE1	<i>Rv1547</i>	Репликативная полимеразы	DinB1(dinX) DinB2(dinP)	<i>Rv1537</i> <i>Rv3056</i>	Мутагенная полимеразная активность, возможная роль в синтезе транс-повреждений
DnaE2	<i>Rv3370c</i>	Важна для мутагенеза, вызванного повреждением; участвует в синтезе повреждений; часть мутагенной кассеты <i>imuA-imuB-dnaE2</i>			
<i>ДНК-лигазы</i>					
LigA	<i>Rv3104c</i>	Эссенциальная НАД <sup>+</sup> -зависимая ДНК-лигаза	LigB	<i>Rv3062</i>	Роль устанавливается
LigD	<i>Rv0938</i>	Есть домены АТФ-зависимой лигазы, полимеразы и фосфостеразы: множественная каталитическая активность	LigC	<i>Rv3731</i>	АТФ-зависимая лигаза, участвует в BER и в NHEJ (роль отката назад), имеет домены нуклеотидилтрансферазы и связывания олигонуклеотидов
<i>Гомологическая рекомбинация: концевая резекция и загрузка RecA</i>					
RecR	<i>Rv3715c</i>	ДНК-связывающая активность	RecF	<i>Rv0003</i>	Связь с одноцепочечной (оц) ДНК, добавочная роль Rec OR пути
RecO	<i>Rv2362c</i>	Отжиг с оцДНК и взаимодействие с RecR, что опосредует загрузку RecA; участвует в стратегии селекции субстрата (SSA)			

Окончание табл. 1

Белок	Ген	Функция	Белок	Ген	Функция
<i>Гомологическая рекомбинация: обмен цепями</i>					
SSBa	<i>Rv0054</i>	Связывается с оцДНК, роль в загрузке RecA	SSBb	<i>Rv2478c</i>	Связывается с оцДНК, играет роль в рекомбинации при стрессе
RecA	<i>Rv2737c</i>	Катализирует обмен цепями			
<i>Гомологическая рекомбинация: разрешение</i>					
RuvA	<i>Rv2593c</i>	Связывается за счет Ruv с соединением Холлидея (СХ) во время миграции его ветвей, мутагенная полимеразная активность, участие в трансповреждениях			
RuvB	<i>Rv2592c</i>	Хеликаза миграции ветвей СХ	RecG	<i>Rv2973c</i>	Полифункциональна, участвует в миграции ветвей в СХ
RuvC	<i>Rv2594c</i>	Резолваза СХ	RuvX	<i>Rv2554c</i>	Резолваза СХ
<i>Путь одностевого отжига</i>			<i>Негомологичное соединение концов</i>		
RecB, C, D	<i>Rv0630c</i> <i>Rv0631c</i> <i>Rv0629c</i>	Концевая резекция хеликазно-нуклеазного комплекса	Ku	<i>Rv0937c</i>	Связывается с разорванными концами ДНК
<i>Другие гены</i>					
RecN	<i>Rv1696</i>	Формирует центр ремонта поломок	RecX	<i>Rv2736c</i>	Контролирует экспрессию RecA
RadA	<i>Rv3585</i>	Потенциальная роль в репарации радиационного повреждения	LexA	<i>Rv2720</i>	Репрессор транскрипции важный для ответа на повреждение ДНК, компонент SOS-ответа
NudC	<i>Rv3199c</i>	НАДН-пирофосфатаза	–	<i>Rv2119</i>	Роль до конца не установлена
–	<i>Rv2979c</i>	Резолваза	–	<i>Rv2464c</i>	ДНК-гликозилаза
Mrr	<i>Rv2528c</i>	Белок рестрикционной системы			

В геноме МБТ 11502 был изучен ПЕН в некоторых генах, относящихся к 3R-системе. Были выявлены мутации в  $44,4 \pm 6,8$  % генов (в 24 из 54), при этом в четырех генах (*ligC*, *uvrC*, *dnaQ*, *recF*) были двойные мутации, в одном гене (*polA*) – 3 мутации, из всех 30 выявленных мутаций 11 были молчащими. У ранее секвенированных нами МБТ 4860, относящихся к LAM генотипу, меньшее количество генов из 3R-системы было подвержено мутациям:  $29,6 \pm 6,2$  % (16 генов из 54). В генах 3R-системы был выявлен незначительный сдвиг ПЕН в сторону замены на аденин и тимин:  $a \rightarrow c/g - 7$  замен;  $t \rightarrow c - 3$  ( $a + t \rightarrow g/c = 10$ ) против  $g \rightarrow a/t - 8$ ,  $c \rightarrow t - 5$  ( $g + c \rightarrow a/t = 13$ ) (табл. 2), в то время как во всем геноме МБТ 11502 в сравнении с МБТ H37Rv отмечается сдвиг в сторону накопления G + C.

Т а б л и ц а 2. Мутации в генах системы репарации, рекомбинации, репликации у *M. tuberculosis* 11502T a b l e 2. Mutations in the genes of the repair, recombination, and replication system in *M. tuberculosis* 11502

Ген	Мутации в гене	Ген	Мутации в гене
<i>ligD</i>	TGC1030CGC (p.C344R)	<i>radA</i>	CAG456CAA (Q152Q)
<i>ligB</i>	CCG271TCG (p.P91S)	<i>recF</i>	ATC734ACC (p.I245T), GGG807GGT (p.G269G)
<i>ligC</i>	CGC938CAC (p.R313H) GTG630GTC (p.V210V)	<i>nei</i>	AGG229CGG (p.R77R)
<i>recC</i>	TTC3117TTT (p.F1039F)	<i>Rv2979</i>	CCG41CGG (p.P14R)
<i>uvrB</i>	GCC1572GCT (p.A524A)	<i>nth</i>	CCC5CGC (p.P2R)
<i>uvrC</i>	GTC 865 ATC (p.V289I) GTG130IGCG (p.V434A)	<i>mutI1</i>	CGA338CGC (p.R246R)
<i>polA</i>	ACC562CCC (p.T186P) AGG562GGG (p.R188G) CCC624CCT (p.P208P)	<i>mutI2</i>	GGA172CGA (p.G58R)
<i>ruvB</i>	CCA843CCG (p.P281P)	<i>mutI4</i>	CGG142GGG (p.R48G)
<i>recD</i>	GAA120GAC (p.E120D)	<i>ogt</i>	GGG36GGA (p.G12G)
<i>nudC</i>	CCG716CGG (p.P239R)	<i>alkA</i>	ATC34GTC (p.I12V)
<i>dnaQ</i>	GGC227GAC (p.G76D), GTG631TTG (p.V211L)	<i>recR</i>	GGT130TGT (p.G44C)
<i>recX</i>	GTT175CTT (p.V59L)	<i>dnaZX</i>	CAC291CAT (p.H97H)

Анализ мутаций в трех штаммах – МБТ 11502 (Beijing – B0/W148 – 100-32), МБТ 4860 (LAM), МБТ 5005 (Beijing B0/W148) – показал, что мутации совпадали у всех трех штаммов в генах *ligD*, *ligB*, *ruvB*, *dnaQ*. У всех трех изолятов отсутствовали мутации в генах *ligA*, *ssb*, *recB*, *recG*, *uvrD1*, *uvrD2*, *ruvA*, *ruvC*, *recA*, *lexA*, *recN*, *dnaN*, *recO*, *dut*, *xthA*, *tagA*, *Rv0944*, *mutT3*, *mpg*, *dinF*, *Rv3644c*, *dinP*, *mrr*, *Rv2464c*.

**Отличие генов 3R-системы у МБТ 11502 и МБТ 4860.** МБТ 4860 отличались от МБТ 11502 тем, что у МБТ 4860 отсутствовали, а у МБТ 11502 присутствовали мутации в генах *uvrC*, *dnaQ*, *recF*, *uvrB*, *uvrC*, *recD*, *nudC*, *recX*, *Rv2979*, *nth*, *mutT1*, *mutT2*, *mutT4*, *ogt*, *alkA*, *recR*, *dnaZX*. У МБТ 4860 выявлены мутации, которых не было у МБТ 5005 и МБТ 11502, в генах *uvrA* (саа403ааа (p.Q135K)), *mfd* (ста3300отс (p.L1100L)), *mutM* (ctg520ttg (p.L174L)), *mutY* (cgg785cag (p.R262Q)), *dinX* (acc916ccc (p.T306P)), *radA* (gtg150gta (p.V50V)). Кроме того, у МБТ 4860 были другие типы мутаций, чем у МБТ 11502 и МБТ 5005, в генах *recC* (у МБТ 4860 aggl604atg (p.R535M), а не ttc3117ttt (p. F1039F)), *dnaQ* (gtc263gcc (p.V88A), а не ggc227gac (p.G76D)), *nei* (acg704atg (p.T235M), а не agg229cgg (R77R)).

**Отличие генов 3R-системы у МБТ 5005 и МБТ 11502.** Профиль мутаций в генах 3R-системы МБТ 5005 и МБТ 11502 был идентичен, за исключением *alkA*, в котором у МБТ 5005 присутствовала делеция G178, отсутствующая у МБТ 11502. Отмечались также различия в мутациях в *ligC* гене. У МБТ 5005 выявлена одна мутация – cgc938cac (p.R313H), а у МБТ 11502 и МБТ 4860 – две мутации (cgc938cac (p.R313H) и gtg630gtc (p.V210V)).

Таким образом, мутации в генах 3R-системы позволяют дифференцировать генотипы Beijing и LAM, что важно для разработки быстрых и нетрудоемких методов типирования МБТ. Появление мутаций в генах 3R-системы может сопровождаться субоптимальной активностью белков и понижением точности в исправлении ошибок репликации, что ведет к увеличению частоты и спектра спонтанных мутаций и появлению новых адаптационных вариантов, обладающих большей жизнеспособностью. Среди МБТ генотипа Beijing подтипа W зарегистрированы ПЕН в генах системы репарации Cis [10]. Гены SOS-репарации, репарации нуклеотидных эксцизий (NER), разрыва соединений вилки репликации имеют более низкий уровень полиморфизма, сравнимый с генами «домашнего хозяйства». МБТ поддерживают стабильность этих генов. Мутации в генах 3R-системы могут являться компенсацией генетической изоляции МБТ и способом адаптации к изменениям микроокружения [10].

У МБТ 11502 в кодоне 95 *gyrA* гена находится мутация agc → acc, в 463 кодоне *katG* гена – ctg (лейцин), что позволяет отнести их к группе 1, согласно предложенной классификации S. Sre-evatsan с соавт. [14]. По организации кодона 95 гена *gyrA* и кодона 463 гена *katG* они схожи с *M. microti*, *M. bovis*, *M. africanum*, что позволяет считать их эволюционно более древними, чем МБТ групп 2 и 3, а следовательно, они могут иметь больший интервал времени для изменений и содержать большее количество мутаций [18]. Таким образом, большее количество мутаций в генах 3R-системы у МБТ 11502 и МБТ 5005 в сравнении с МБТ 4860 и МБТ H37Rv может быть обусловлено более ранним возникновением и более активным распространением МБТ 11502 и МБТ 5005 в ходе эпидемического процесса.

**Гены PE\_PGRS.** В геноме МБТ чаще, чем у других микроорганизмов, встречаются GC-содержащие кодоны, кодирующие Ala, Gly, Pro, Arg и Trp, и снижена доля кодонов с аденином, кодирующих аминокислоты Asn, Ile, Lys, Phe и Tyr. Приблизительно 10 % кодирующей способности генома МБТ связано с семейством генов PE (включая PE\_PGRS) и PPE, присутствующих только у рода *Mycobacterium* [19, 20]. У PE белков на N-конце находится повторяющийся мотив Pro–Glu (пролин-глутама), содержащий у PPE белков Pro–Pro–Glu (пролин-пролин-глутамат). Наиболее распространенными у МБТ являются PE белки класса PGRS. В составе этих белков находятся многочисленные tandemные повторы Gly–Gly–Ala или Gly–Gly–Asn. Белки PE\_PGRS кодируются 65 генами (некоторые из них могут быть псевдогенами), 51 из которых обычно кодирует функциональные белки. Белки PE\_PGRS имеют консервативную структуру, включающую три основных домена. На N-конце располагается домен PE. За ним располагается домен PGRS, который может быть разным по аминокислотной последовательности и размеру, но включает множество аминокислотных повторов GGA–GGX. Эти два домена соединяет высококонсервативная последовательность, содержащая мотив GRPLI, который является трансмембранным

и обеспечивает фиксацию PE\_PGRS белков в клеточной стенке микобактерий. Далее располагается уникальный С-концевой домен, размер которого может варьироваться от нескольких до 300 аминокислот [19, 20]. Гены PE\_PGRS появились у медленно растущих микобактерий, расширились и диверсифицировали у микобактерий туберкулезного комплекса и некоторых других патогенных микобактерий. У непатогенных микобактерий многие из них подвергнуты делеции, что может свидетельствовать об их важной роли в вирулентности и во взаимодействии с организмом хозяина. Регуляторы транскрипции этих генов могут действовать как молекулярные переключатели патогенного жизненного цикла МБТ [20]. Функции белков PE\_PGRS недостаточно изучены. Эти белки, как правило, либо секретируются, либо экспонируются на поверхности микобактерий, играют роль антигенов [21, 22], вызывая иммунный ответ (некоторые – сильный Т-клеточный иммунитет и иммунный кворум сенсинг). Они демонстрируют антигенную изменчивость [11, 23]. Иммунофлуоресцентный анализ МБТ показал присутствие PE\_PGRS на поверхности клеток МБТ H37Rv и вакцинного штамма БЦЖ, а также во фракции лизатов МБТ, содержащих компоненты клеточной стенки. PE\_PGRS, локализуясь на поверхности клеток, могут влиять на взаимодействия МБТ с поверхностными структурами других клеток, обеспечивая поверхностные клеточные взаимодействия [24]. Вариабельность PE\_PGRS может иметь диагностическое значение в типировании МБТ [25]. Белковый комплекс PE25 (Rv2431c)/PPE41 (Rv2430c) может вызывать некроз клеток-хозяев. У другого белка, PE\_PGRS33, домен PGRS индуцирует апоптоз макрофагов через TLR2 [26], а полный белок вызывает некроз [27]. Исследования иммуногенных свойств белка PE\_PGRS33 и каждого его домена в отдельности на мышах BALB/c показали, что все они способны индуцировать продукцию антител и секрецию IFN- $\gamma$ . Домен PE белка PE\_PGRS33 стимулирует более высокую пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов по сравнению с доменом PGRS. У людей секреция IFN- $\gamma$  в ответ на PE\_PGRS33 была обнаружена как у пациентов с латентным туберкулезом, так и у здоровых вакцинированных лиц. Эпитопы в домене PGRS могут индуцировать образование антител. Таким образом, белок PE\_PGRS33 и его домены PE и PGRS участвуют в формировании иммунного ответа против МБТ [28, 29].

Анализ генов PE\_PGRS в геноме МБТ 11502 показал их вариабельность, которая варьировалась у разных представителей этого семейства генов (табл. 3). Ранее было установлено, что в этих генах присутствуют последовательности –CGGCGGCAA и –GCCGGTGTG, которые не встречаются в других генах МБТ [19].

Анализ генома МБТ 11502, H37Rv, 4860, 5005 свидетельствует о высоком содержании тетра-нуклеотидов CGGC в большинстве генов семейства PE\_PGRS. Доля CGGC в генах PE\_PGRS варьируется от 2,11 до 8,42 %, в то время как в среднем в геноме МБТ их доля составляет 1,62 %. Установлено, что в некоторых генах генома МБТ комбинация тетра-нуклеотидов CGGC вообще не встречается (Rv0011, Rv0100, Rv0460, Rv0616A, Rv0691A, Rv0722, Rv0863, Rv0909, Rv1038c, Rv1197, Rv2347c, Rv2452c, Rv3053c, Rv3320c).

Установлено, что ряд генов семейства PE\_PGRS не имели мутаций (PE\_PGRS 5, 12, 14, 15, 16, 31, 34, 39, 42) у МБТ 11502, что совпадало с отсутствием мутаций у МБТ 4860. У МБТ 5005 мутации в этих генах выявлялись. У штаммов МБТ 4086, 5005, 11502 не определялись мутации в генах PE\_PGRS 11, 29, 35, 40, 62. Не выявлены мутации у МБТ 11502 и 5005 в PE\_PGRS 60, а у МБТ 4860 они присутствовали. Только у МБТ 11502 была мутация в PE\_PGRS 46, а у остальных штаммов не было мутаций. Среднее содержание CGGC для PE\_PGRS с отсутствием мутаций у МБТ 11502 составило 3,99 %, ctgc – 0,76, суммарное содержание комбинаций нуклеотидов – 10,88, а ggg – 2,65, gggg – 0,83 %. По одной мутации у всех штаммов было выявлено в генах PE\_PGRS 1, 24, 32, 37, 48, 59, при этом одна мутация присутствовала также у МБТ 11502 и 5005 в генах PE\_PGRS 15 и 24, а у МБТ 4860 мутации отсутствовали. В гене PE\_PGRS 25 была зарегистрирована одна мутация – у МБТ 11502, а у МБТ 4860 и МБТ 5005 их было больше – 4 и 2 соответственно. В генах с одной мутацией у МБТ 11502 содержание CGGC составляло 5,1 %, ctgc – 0,54, ggg – 3,4, gggg – 1,27, ggcg – 1,43, cggc – 2,38 %.

Две мутации присутствовали в гене PGRS 2 (у всех изолятов МБТ 11502, 5005, 4860 содержание cggc – 5,53) и в генах PGRS 38, 43, 45, 58 (среднее содержание CGGC – 4,63 %) у МБТ 11502

Т а б л и ц а 3. Изменчивость генов PE\_PGRS у *M. tuberculosis* 11502 в сравнении с *M. tuberculosis* 5005 и 4860T a b l e 3. Variability of PE\_PGRS genes in *M. tuberculosis* 11502 compared to *M. tuberculosis* 5005 and 4860

Гены	Присутствие мутаций			Средняя доля мутаций в генах, %				
	МБТ 11502	МБТ 5005	МБТ 4860	cggc	ctgc	ggg	gggg	суммарно gccg, cgcg, cggc, ggg, gggg
Нет мутаций								
PE_PGRS 5, 12, 14, 16, 31, 34, 39, 42	Нет	Да	Нет	3,99	0,76	2,65	0,83	10,88
PE_PGRS 11, 29, 35, 40, 62	Нет	Нет	Нет					
PE_PGRS 46	Нет	Да	Да					
PE_PGRS 60	Нет	Нет	Да					
Одна мутация								
PE_PGRS 1, 32, 37, 48, 59	Да	Да	Да	4,87	0,46	3,58	1,25	13,81
PE_PGRS 15, 24	Нет	Да	Нет					
PE_PGRS 25	Да	Да, 2*	Да, 4*					
Две мутации								
PE_PGRS 2	Да	Да	Да	5,53	0,55	3,14	1,43	15,71
PE_PGRS 38, 43, 45, 58	Да	Да	Нет	4,63	0,57	3,75	1,39	14,23
Три мутации								
PE_PGRS 44	Да	Да	Нет	5,58	0,86	1,9	0,61	13,0
PE_PGRS 47	Да	Да	Да	5,51	0,8	3,04	1,08	14,57
Четыре мутации								
PE_PGRS 20	Да	Да	Нет	6,61	0,57	2,23	0,43	13,86
Множественные перестройки								
PE_PGRS 3, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 17, 19, 21, 22, 23, 27, 28, 53, 54, 55, 57	Да	Да	Да	6,05	0,45	3,47	1,59	15,86

П р и м е ч а н и е. \* – количество мутаций.

и МБТ 5005 (у МБТ 4860 не было мутаций). Три мутации выявлены в генах PE\_PGRS 44 (у МБТ 11502 и 5005) и PE\_PGRS 47 (у всех штаммов). Содержание CGGC в генах PE\_PGRS 44 и 47 составляло 5,58 и 5,51 % соответственно. Четыре мутации присутствовали в гене PE\_PGRS 20 у МБТ 11502 и 5005, при этом содержание CGGC в этом гене составило 6,61 %. Множественные перестройки выявлены в генах PE\_PGRS 3, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 17, 19, 21, 22, 23, 27, 28, 53, 54, 55, 57. Средний удельный вес комбинации нуклеотидов CGGC в этих генах – 6,05 % (варьировались от 4,89 до 8,42 %). Доля остальных комбинаций составила: ggg – 3,47 %, gggg – 1,59, gccg – 1,48, gccg – 2,81, gtgc – 0,45 %, суммарный показатель всех комбинаций – 15,86 % (варьировался от 13,85 до 19,11 %).

В генах PGRS 18, 26, 30, 33, 49, 50, 51, 52, 61 происходило одномоментное выпадение нескольких нуклеотидов, при этом среднее содержание CGGC составляло 5,81 %, а суммарный показатель всех комбинаций нуклеотидов – 14,72. Гены PE\_PGRS 8 и 36 не были включены в исследования. В генах PE\_PGRS 3, 7, 10, 20, 22, 27, 30, 34, 38, 43, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57 присутствовала ранее описанная последовательность – CGGCGCAA [19] в количестве от 10 до 53 штук.

Таким образом, в генах с множественными проблемами (PE\_PGRS 3, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 17, 19, 21, 22, 23, 27, 28, 53, 54, 55, 57) зарегистрировано высокое содержание GCCG (в среднем 6,05 % от структуры гена).

С момента приобретения толстой гидрофобной клеточной стенки МБТ не используют механизмы горизонтального переноса генов для адаптации и эволюции. Это должно обеспечивать генетическую консервативность и стабильность биологических свойств МБТ, в том числе и антигенных, и, как следствие этого, развитие эпидемического процесса при туберкулезе в популяции людей могло бы быть схожим с *Corynebacterium diphtheria*, которые проявляют стабильность биологических свойств. Но количество заболевших туберкулезом во многих регионах мира не уменьшается, формируются генетические клоны с МЛУ, с пре-ШЛУ и ШЛУ в пределах

разных генотипов, что свидетельствует о наличии эффективных механизмов изменчивости МБТ и адаптации к меняющимся условиям. Таким образом, если микроорганизмы, вовлеченные в латеральный перенос генов, способны приобретать нужные в данной среде гены от других симбионтов, то МБТ, лишённые горизонтального генетического обмена, должны иметь механизмы с промутагенным эффектом. Следовательно, формирование мутаций – это одна из важных стратегий выживания МБТ. Кроме мутаций, у МБТ адаптацию к микроокружению могут обеспечивать реаранжировка положения генов, образование тандемных повторов, инсерция копий IS-элементов. Изучение механизмов, приводящих к накоплению мутаций, является важным направлением исследований.

Конформационный анализ ДНК в местах мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к ПТЛС (рис. 1), показывает, что мутации возникают преимущественно в местах формирования вторичных структур ДНК (шпилек), что может привести к перераспределению энергии взаимодействий, зарядов и, как следствие, к ошибкам репликации и возникновению мутаций.

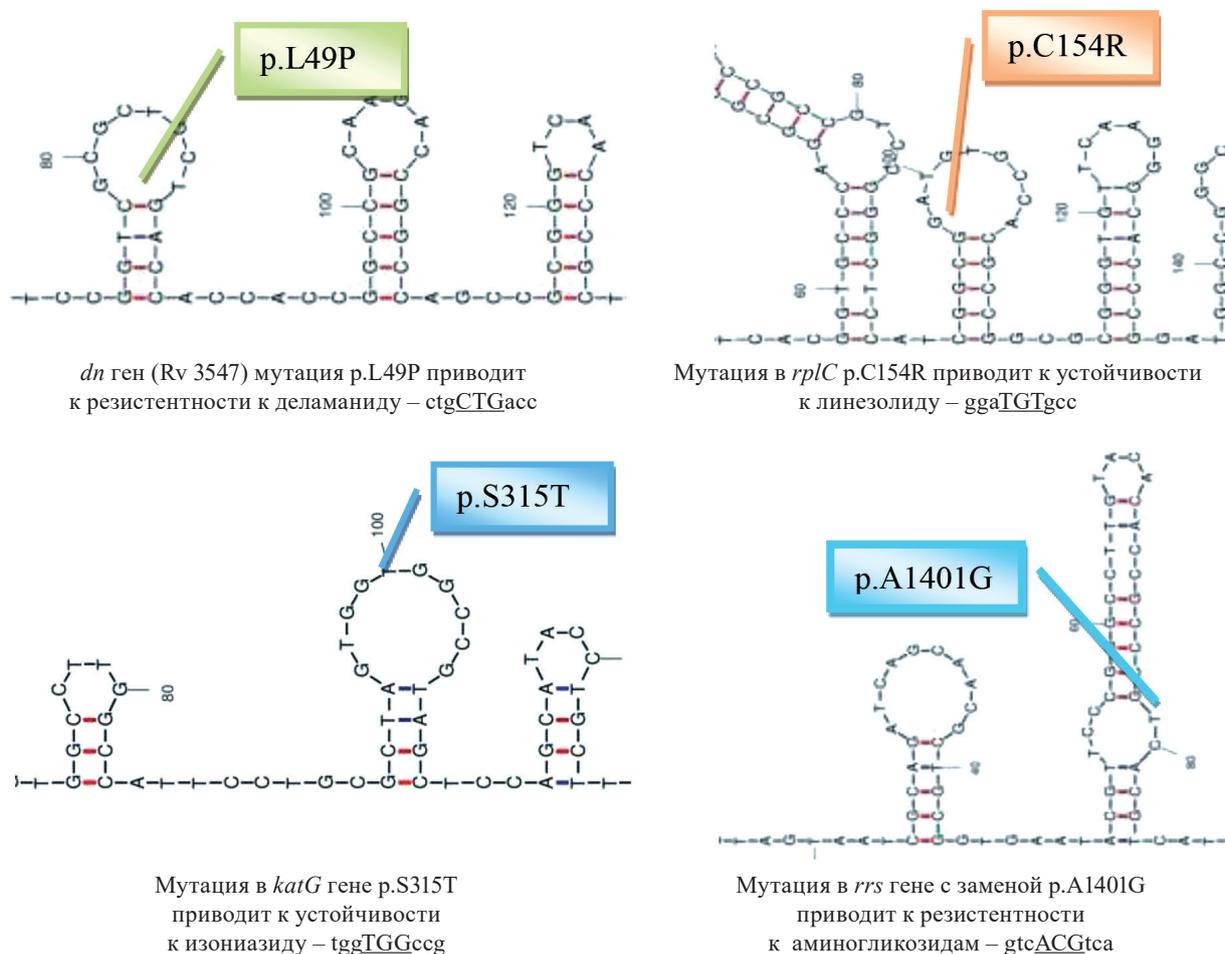


Рис. 1. Конформация генов в локусах, где происходят мутации, ассоциированные с устойчивостью к ПТЛС: в генах *katG* (к изониазиду), *rrs* (к аминогликозидам), *ddn* (к даламаниду), *rplC* (к линезолиду) (анализ конформации с помощью веб-сервиса mfold)

Fig. 1. Conformation of the gene regions where there occur mutations associated with resistance to anti-TB drugs: genes *katG* (to isoniazid), *rrs* (to aminoglycosides), *ddn* (delamanid), *rplC* (linezolid) (web-based conformation analysis by mfold service)

Проведенный нами анализ конформационных структур МБТ свидетельствует, что в их формировании важную роль играют следующие группы нуклеотидов: GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC. Ранее описанные последовательности –CGGCGGCAA и –GCCGGTGTG [11], присутствующие только в генах PE, PPE, также несут в своем составе CGGC и участвуют в образовании шпилек (рис. 2).

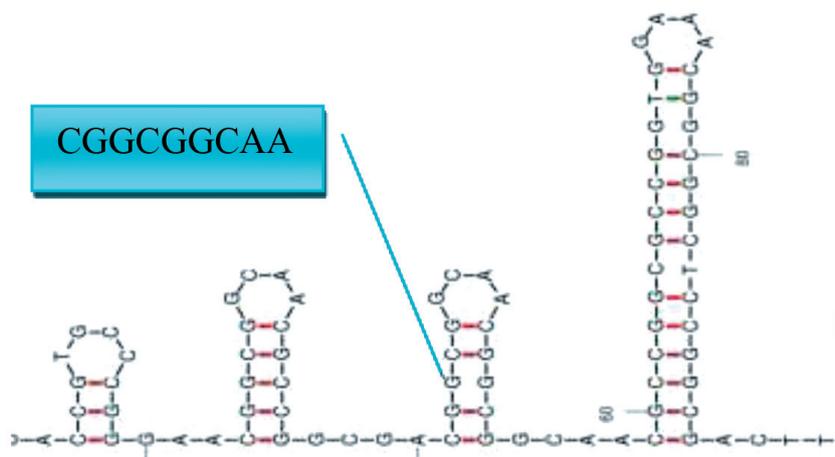


Рис. 2. Конформация ДНК PE\_PGRS53 в месте локализации повторов CGGCGGCAA, встречающихся только в генах PE и PE\_PGRS (анализ конформации с помощью веб-сервиса mfold)

Fig. 2. Gene PE\_PGRS53: DNA conformation of loci with CGGCGGCAA repeats found only in the PE and PE\_PGRS genes (conformation analysis by the mfold web service)

Одним из важных ферментов, участвующих в репликации, является ДНК-гираза. У большинства современных штаммов МБТ присутствует мутация в 95-м кодоне гена *gyrA*, кодирующем субъединицу А ДНК-гиразы, в отличие от референтного штамма МБТ Н37Rv. У МБТ 11502 в *gyrA* гене кроме мутации в 95-м кодоне выявлены мутации в кодоне 61 – *gag61cag* (p.Gly21Gln), *ggc2003gac* (p.Gly668Asn). Ген *gyrA* МБТ 4860 имел мутации *gag61cag* (p.E21Q), *agc284acc* (p.S95T), *ggc739agc* (p.G247S), МБТ 5005 – *gag61cag* (p.E21Q), *agc284acc* (p.S95T). Мутации в *gyrA* гене, характерные для современных линий МБТ, могут влиять на активность гиразы-топоизомеразы, которая предотвращает нежелательное перекручивание ДНК перед вилкой репликации и транскрипции, а также отвечает за развязывание скопированных нитей ДНК за вилкой репликации, что в свою очередь может способствовать формированию шпилек ДНК и индуцировать мутации [30, 31]. Выявленные у МБТ 11502 мутации локализуются в каталитическом ядре гиразы, к которому относятся остатки 426–675 гена *gyrB* и остатки 2–500 гена *gyrA* [31]. Структура активного центра гиразы такова, что ДНК, находясь в гиразе-топоизомеразе, располагается в области, содержащей много положительно заряженных и консервативных аминокислот, и относительно выпрямлена; изменение аминокислоты в кодонах 21 и 95 *gyrA* может влиять на активность ДНК-гиразы и на положение ДНК в ферменте, нарушая точность дальнейшей репликации [32]. В ходе исследований установлено, что у МБТ 4860 было меньше мутаций в геноме, включая гены 3R-системы, в сравнении с МБТ 11502 и 5005, что может быть обусловлено в том числе изменениями в функциональной активности *gyrA*, связанными с мутациями, профиль которых у штаммов отличался: две мутации у них совпадали, третья мутация отличалась у МБТ 11502 и МБТ 4860.

Установленное нами высокое содержание GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC в некоторых генах PE\_PGRS может быть причиной высокой их изменчивости. Повышенное содержание нуклеотидов GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC связано также с накоплением в белках аминокислот, кодируемых кодонами, богатыми G + C, – пролина, глицина, аланина, аргинина. Исследование аминокислотного состава протеома МБТ, проведенное S. T. Cole с соавт., подтверждает (статистически значимо) присутствие повышенного содержания аминокислот Ala, Gly, Pro, Arg и Trp, которые кодируются G + C богатыми кодонами, и показывает сравнительное сокращение использования аминокислот, кодируемых A + T богатыми кодонами, такими как Asn, Ile, Lys, Phe и Tyr [11]. Высокое содержание аминокислот Gly, Pro, Ala может иметь значение для выживания микроорганизмов, так как последовательность аминокислот, а следовательно-

но, и структура белков модифицируются, чтобы соответствовать особенностям действия определенных стрессовых факторов окружающей среды. Одним из самых древних эволюционных факторов на планете могло быть осмотическое давление, которое предопределяло эволюцию на ранних этапах формирования биосферы и продолжает играть важную роль, особенно для тех микроорганизмов, которые обитают во внешней, а не в изоосмотической среде живых организмов. Для преодоления дестабилизирующего воздействия осмотического стресса микроорганизмы накапливают преимущественно органические растворимые вещества – осмолиты [32]: аминокислоты (пролин, глицин, аланин), полиолы, сахара и производные, метиламины и метилсульфоний. Белки в условиях высокой концентрации ионов в окружающей среде должны содержать аминокислоты-осмолиты, а также множественные вставки аминокислот (пептид-вставки), которые могут увеличить гибкость белков [33]. Установлено различие в количестве пролина в альфа-амилазе психрофилов и мезофиллов/термофилов. Психрофильная альфа-амилаза содержит только 13 остатков пролина, в то время как мезофильные и термофильные гомологи имеют 19 и 25 соответственно. Пролин ограничивает вращение белкового остова за счет взаимодействия азот-пирролидинового кольца. Снижая уровень пролина, психрофилы повышают гибкость белка [34]. Таким образом, накопление пролина, глицина, аланина позволяет сохранять свойства белков в условиях осмотического стресса, что особенно важно для поверхностных белков, к которым относятся PE\_PGRS белки.

В ходе формирования биоразнообразия планеты геном с высоким содержанием G + C мог иметь важное значение: он мог обеспечивать мутационную изменчивость и дивергенцию за счет присутствия среди нуклеотидов GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC, меняющих топографию ДНК. За счет присутствия богатых G + C кодонов, обуславливающих высокое содержание аминокислот-осмолитов (пролина, глицина, аланина), особенно в поверхностных белках, геном мог повышать устойчивость к осмотическому стрессу – одному из наиболее древних селективных факторов. Таким образом, наличие белков PE\_PGRS свидетельствует о значимой роли высокого содержания G + C, вторичных конформационных структур ДНК, пролина, глицина, аланина в адаптации к меняющимся условиям среды. Мутации в гене *gyrA* и генах 3R-системы, выявленные у секвенированных МБТ генотипа Beijing и LAM, могут приводить к снижению точности работы системы репликации и репарации и накоплению мутаций, что усиливает адаптацию МБТ к меняющимся условиям. Сдвиг мутаций в сторону накопления A + T в белках 3R-системы, в отличие от суммарного сдвига мутаций в сторону G + C в геноме, свидетельствует о разнонаправленности эволюционных изменений (цитоплазматических, поверхностных и 3R-системы) различных структур.

Филогенетические исследования ряда авторов позволили сформулировать гипотезу эволюции МБТ [35, 36]. Микобактерии туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* и *M. caprae*) имеют различия в фенотипических признаках и отличаются спектром хозяев среди млекопитающих. Они характеризуются высокой генетической гомогенностью: на долю сайтов синонимичных точечных мутаций приходится 0,01–0,03 %, в геноме присутствуют незначительные признаки генетического обмена, что позволяет предположить, что ныне циркулирующие микобактерии туберкулезного комплекса появились из одного предшественника 20 000–35 000 лет назад. *M. canettii* и другие микобактерии с гладкими колониями могут иметь наибольшее сходство с линией – предшественницей микобактерий, из которой произошли современные микобактерии [35, 36]. Как механизм адаптации горизонтальный перенос генов был возможен у предшественников МБТ, имевших гладкие колонии. Тогда геном МБТ подвергался перестройке за счет горизонтального переноса генов. В структуре генов «домашнего хозяйства» МБТ есть вкрапления, мозаично разбросанные по генам, которые идентичны или очень близки по структуре к микобактериям, образующим гладкие колонии. Поэтому настоящий геном МБТ – это результат реаранжировки генетических последовательностей – базисных и приобретаемых вследствие горизонтального переноса генов, который был возможен еще до формирования предшественника *M. prototuberculosis*. Гены геномных островков Rv3108-

Rv3126c и Rv3173c-Rv3191c, гены Rv3117, Rv3118 и Rv3119 могут быть приобретены от *Actinobacteria*, включающих род *Mycobacterium* и порядок Bifidobacteriales; от *Proteobacteria*, включающих порядки Burkholderiales, Pseudomonadales, Rhizobiales и Sphingomonadales, и от бактериофагов [37].

В нашей работе показано, что на данном этапе эволюции МБТ мутации являются важной стратегией адаптации этого патогена к меняющимся условиям. Возникновение мутаций связано с первичной структурой ДНК: высоким содержанием G + C и присутствием нуклеотидов GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC, которые приводят к формированию вторичных структур ДНК и меняют топографию ДНК. Спонтанные мутации связаны с изменением энергетических взаимоотношений между нуклеотидами в ходе формирования вторичных структур ДНК, образующихся с участием GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC. Во вторичных структурах происходит перераспределение энергии и зарядов, что может сопровождаться ошибками репликации и появлением мутаций. Возникновение события мутации зависит от ряда дополнительных факторов, которые могут нейтрализовать возникающие энергетические изменения, а также нарушать точность процесса репликации, репарации (мутации в *gyrA* гене, в генах 3R-системы).

**Заключение.** В геноме МБТ 11502, относящихся к генотипу Beijing, кластеру 100-32, выявлены мутации в  $44,4 \pm 6,8$  % генов (в 24 из 54), относящихся к 3R-системе, в то время как у МБТ 4860, относящихся к генотипу LAM, меньшее количество генов из системы 3R было подвержено мутациям:  $29,6 \pm 6,2$  % (16 генов из 54). В генах 3R-системы выявлен незначительный сдвиг ПЕН в сторону замены на аденин и тимин, в то время как для всего генома МБТ 11502 (в сравнении с МБТ H37Rv) было характерно накопление G + C. Появление мутаций в генах 3R-системы может сопровождаться субоптимальной активностью белков и понижением точности в исправлении ошибок репликации, что ведет к увеличению частоты и спектра спонтанных мутаций и появлению новых адаптационных вариантов, обладающих большей жизнеспособностью.

Охарактеризованные мутационные отличия МБТ 11502, относящегося к генотипу Beijing, подтипу B0/W148, кластеру 100-32, и МБТ 4860, относящегося к генотипу LAM, могут быть использованы для разработки нетрудоемких методов детекции генотипов для эпидемиологического типирования МБТ.

Анализ генов PE\_PGRS в геноме МБТ 11502, 4860 и 5005 показал, что их вариабельность варьировалась у разных представителей этого семейства генов. Анализ генома МБТ 11502, H37Rv, 4860, 5005 свидетельствует о высоком содержании тетрануклеотидов CGGC в большинстве генов семейства PE\_PGRS, где доля CGGC варьируется от 2,11 до 8,42 %, в то время как в среднем их доля в геноме составляет 1,62 %. Установлено, что в некоторых генах генома МБТ комбинация тетрануклеотидов CGGC (Rv0011, Rv0100, Rv0460, Rv0616A, Rv0691A, Rv0722, Rv0863, Rv0909, Rv1038c, Rv1197, Rv2347c, Rv2452c, Rv3053c, Rv3320c) вообще не встречается.

Конформационный анализ ДНК в местах мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к ПТЛС, показал, что формирование вторичных структур ДНК, происходит преимущественно за счет комбинаций нуклеотидов GCCG, CGGC, GCGC, GGG, GGGG, CTGC, а мутации в генах возникают, как правило, в местах формирования вторичных структур ДНК (шпилек), в которых может происходить перераспределение энергии взаимодействий, зарядов, и, как следствие, могут возникать ошибки репликации и мутации. На возникновение события мутации может влиять ряд дополнительных факторов, которые могут нейтрализовать возникающие энергетические изменения, а также нарушать точность процесса репликации, репарации (мутации в *gyrA* гене, в генах 3R-системы).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis* / M. Caws [et al.] // PLoS Pathog. – 2008. – Vol. 4, N 3. – Art. e1000034. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000034>
2. Multisectoral accountability framework to accelerate progress to end tuberculosis by 2030 : WHO/CDS/TB/2019.10 WHO, 2019: 30.
3. Глобальные отчеты Всемирной организации здравоохранения по туберкулезу: формирование и интерпретация / И. А. Васильева [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 5. – С. 7–16.
4. Koonin, E. V. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world / E. V. Koonin, Y. I. Wolf // Nucl. Acids Res. – 2008. – Vol. 36, N 21. – P. 6688–6719. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn668>
5. Мокроусов, И. В. Методологические подходы к генотипированию *Mycobacterium tuberculosis* для эволюционных и эпидемиологических исследований / И. В. Мокроусов // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 603–614.
6. Singh, A. Guardians of the mycobacterial genome: A review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Singh // Microbiology. – 2017. – Vol. 163, N 12. – P. 1740–1758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000578>
7. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis* / L. Baker [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10, N 9. – P. 1568–1577. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040046>
8. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family / M. Ebrahimi-Rad [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 9, N 7. – P. 838–845. <https://doi.org/10.3201/eid0907.020803>
9. Neeley, W. L. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products / W. L. Neeley, J. M. Essigmann // Chem. Res. Toxicol. – 2006. – Vol. 19, N 4. – P. 491–505. <https://doi.org/10.1021/tx0600043>
10. Mestre, O. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair / O. Mestre, T. Luo, T. Dos Vultos // PloS ONE. – 2011. – Vol. 6, N 1. – Art. e16020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016020>
11. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S. Cole [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 393, N 6685. – P. 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
12. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set / I. Filliol [et al.] // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, N 2. – P. 759–772. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.759-772.2006>
13. Arnold, C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* / C. Arnold // Clin. Microbiol. Infection. – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 120–128. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01637.x>
14. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis* revisited / T. Dos Vultos [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. – 2009. – Vol. 33, N 3. – P. 471–487. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00170.x>
15. Essential roles for imuA'-and imuB'-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis* / D. F. Warner [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 107, N 29. – P. 13093–13098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002614107>
16. Shuman, S. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining / S. Shuman, M. Glickman // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – Vol. 5. – P. 852–861. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1768>
17. Kurthkoti K. Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria / K. Kurthkoti, U. Varshney // Tuberculosis. – 2011. – Vol. 91, N 6. – P. 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.06.005>
18. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination / S. Sreevatsan [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1997. – Vol. 94, N 18. – P. 9869–9874. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9869>
19. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS protein Rv0297 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through toll-like receptor 4 / S. Grover [et al.] // MBio. – 2018. – Vol. 9, N 3. – P. e01017-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01017-18>
20. Mohareer, K. Transcriptional regulation of *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes: a molecular switch to virulence / K. Mohareer, S. Tundup, S. E. Hasnain // Microb. Physiol. – 2011. – Vol. 21, N 3–4. – P. 97–109. <https://doi.org/10.1159/000329489>
21. PE\_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a specialized molecular task force at the forefront of host-pathogen interaction / F. De Maio [et al.] // Virulence. – 2020. – Vol. 11, N 1. – P. 898–915. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1785815>
22. Frequent homologous recombination events in *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE multigene families: potential role in antigenic variability / A. Karboul [et al.] // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190, N 23. – P. 7838–7846. <https://doi.org/10.1128/JB.00827-08>
23. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: perhaps more? / Y. Akhter [et al.] // Biochimie. – 2012. – Vol. 94, N 1. – P. 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.026>
24. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells / M. J. Brennan [et al.] // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69, N 12. – P. 7326–7333. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7326-7333.2001>
25. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility/ K. Kremer [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37, N 8. – P. 2607–2618. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2607-2618.1999>

26. Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$  / S. Basu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, N 2. – P. 1039–1050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604379200>
27. Cadieux, N. Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 protein / N. Cadieux, M. Parra, H. Cohen // *Microbiology.* – 2011. – Vol. 157 (pt. 3). – P. 793–804. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041996-0>
28. The PGRS domain from PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is target of humoral immune response in mice and humans / I. Cohen [et al.] // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 27, N 5. – Art. 236. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00236>
29. Comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pe and ppe genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints / C. R. McEvoy [et al.] // *PloS ONE.* – 2012. – Vol. 7, N 4. – Art. e30593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030593>
30. CryoEM structures of open dimers of gyrase A in complex with DNA illuminate mechanism of strand passage / K. M. Soczek [et al.] // *Elife.* – 2018. – Vol. 20, N 7. – Art. e41215. <https://doi.org/10.7554/eLife.41215>
31. Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective / J. C. Wang // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3, N 6. – P. 430–440. <https://doi.org/10.1038/nrm831>
32. The first study on the impact of osmolytes in whole cells of high temperature-adapted microorganisms / M. Salvador-Castell [et al.] // *Soft Matter.* – 2019. – Vol. 15, N 41. – P. 8381–8391. <https://doi.org/10.1039/C9SM01196J>
33. The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles / C. Brininger [et al.] // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* – Academic Press, 2018. – Vol. 84. – P. 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.016>
34. Feller, G. Protein folding at extreme temperatures: Current issues / G. Feller // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* – Academic Press, 2018. – Vol. 84. – P. 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.003>
35. Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis* / A. S. Bouwman [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 109, N 45. – P. 18511–18516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209444109>
36. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis* / L. Baker [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 10, N 9. – P. 1568–1577. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040046>
37. Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli / J. Becq [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2007. – Vol. 24, N 8. – P. 1861–1871. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm111>

## References

1. Caws M., Thwaites G., Dunstan S., Hawn T. R., N. T. Lan N., Thuong N. T. T. [et al.]. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS Pathogens*, 2008, vol. 4, no. 3, art. e1000034. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000034>
2. *Multisectoral accountability framework to accelerate progress to end tuberculosis by 2030* : WHO/CDS/TB/2019.10 WHO, 2019: 30.
3. Vasil'eva I. A., Belilovskii E. M., Borisov S. E., Sterlikov S. A. World Health Organization Global Tuberculosis Reports: Formation and Interpretation. *Tuberkulez i bolezni legkikh* [Tuberculosis and lung diseases], 2017, vol. 95, no. 5, pp. 7–16 (in Russian).
4. Koonin E. V., Wolf Y. I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, no. 21, pp. 6688–6719. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn668>
5. Mokrousov I. V. Methodological approaches to the genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* for evolutionary and epidemiological studies. *Infektsiya i immunitet* [Infection and immunity], 2012, vol. 2, no. 3, pp. 603–614 (in Russian).
6. Singh, A. Guardians of the mycobacterial genome: A review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 2017, vol. 163, no. 12, pp. 1740–1758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000578>
7. Baker L., Brown T., Maiden M. C., Drobniewski F. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, vol. 10, no. 9, pp. 1568–1577. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040046>
8. Ebrahimi-Rad M., Bifani P., Martin C., Kremer K., Samper S., Rauzier J., Kreiswirth B., Blazquez J., Jouan M., van Soolingen D., Gicquel B. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, vol. 9, no. 7, pp. 838–845. <https://doi.org/10.3201/eid0907.020803>
9. Neeley W. L., Essigmann J. M. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 4, pp. 491–505. <https://doi.org/10.1021/tx0600043>
10. Mestre O., Luo T., Dos Vultos, T., Kremer K., Murray A., Namouchi A. [et al.]. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PloS ONE*, 2011, vol. 6, no. 1, art. e16020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016020>
11. Cole S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D. [et al.]. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6685, pp. 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
12. Filliol I., Motiwala A. S., Cavatore M., Qi W., Hazbón M. H., del Valle M. B. [et al.]. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of Bacteriology*, 2006, vol. 188, no. 2, pp. 759–772. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.759-772.2006>
13. Arnold C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, vol. 13, no. 2, pp. 120–128. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01637.x>
14. Dos Vultos T., Mestre O., Tonjum T., Gicquel B. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis* revisited. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, vol. 33, no. 3, pp. 471–487. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00170.x>

15. Warner D. F., Ndwandwe D. E., Abrahams G. L., Kana B. D., Machowski E. E., Venclovas Č., Mizrahi V. Essential roles for imuA'- and imuB-encoded accessory factors in DnaE2-dependent mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no. 29, pp. 13093–13098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002614107>
16. Shuman S., Glickman M. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, vol. 5, pp. 852–861. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1768>
17. Kurthkoti K., Varshney U. Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria. *Tuberculosis*, 2011, vol. 91, no. 6, pp. 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.06.005>
18. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K. E., Connell N. D., Kreiswirth B. N., Whittam T. S., Musser J. M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, vol. 94, no. 18, pp. 9869–9874. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9869>
19. Grover S., Sharma T., Singh Y., Kohli S., Singh A., Semmler T., Hasnain S. E. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS protein Rv0297 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through toll-like receptor 4. *MBio*, 2018, vol. 9, no. 3, pp. e01017-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01017-18>
20. Mohareer K., Tundup S., Hasnain S. E. Transcriptional regulation of *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes: a molecular switch to virulence. *Microbial Physiology*, 2011, vol. 21, no. 3–4, pp. 97–109. <https://doi.org/10.1159/000329489>
21. De Maio F., Berisio R., Manganelli R., Delogu G. PE\_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a specialized molecular task force at the forefront of host pathogen interaction. *Virulence*, 2020, vol. 11, no. 1, pp. 898–915. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1785815>
22. Karboul A., Mazza A., Gey van Pittius N. C., Ho J. L., Brousseau R., Mardassi H. Frequent homologous recombination events in *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE multigene families: potential role in antigenic variability. *Journal of Bacteriology*, 2008, vol. 190, no. 23, pp. 7838–7846. <https://doi.org/10.1128/JB.00827-08>
23. Akhter Y., Ehebauer M. T., Mukhopadhyay S., Hasnain S. E. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: perhaps more? *Biochimie*, 2012, vol. 94, no. 1, pp. 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.026>
24. Brennan M. J., Delogu G., Chen Y., Bardarov S., Kriakov J., Alavi M., Jacobs Jr. W. R. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infection and Immunity*, 2001, vol. 69, no. 12, pp. 7326–7333. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7326-7333.2001>
25. Kremer K., Van Soolingen D., Frothingham R., Haas W. H., Hermans P. W. M., Martin C. [et al.]. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol. 37, no. 8, pp. 2607–2618. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2607-2618.1999>
26. Basu S., Pathak S. K., Banerjee A., Pathak S., Bhattacharyya A., Yang Z., Talarico S., Kundu M., Basu J. Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, no. 2, pp. 1039–1050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604379200>
27. Cadieux N., Parra M., Cohen H., Maric D., Morris S. L., Brennan M. J. Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 protein. *Microbiology*, 2011, vol. 157 (pt. 3), pp. 793–804. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041996-0>
28. Cohen I., Parada C., Acosta-Gío E., Espitia C. The PGRS domain from PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is target of humoral immune response in mice and humans. *Frontiers in Immunology*, 2014, vol. 27, no. 5, art. 236. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00236>
29. McEvoy C. R., Cloete R., Müller B., Schürch A. C., van Helden P. D., Gagneux S., Warren R. M., Gey van Pittius N. C. Comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pe and ppe genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PloS ONE*, 2012, vol. 7, no. 4, art. e30593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030593>
30. Soczek K. M., Grant T., Rosenthal P. B., Mondragon A. CryoEM structures of open dimers of gyrase A in complex with DNA illuminate mechanism of strand passage. *Elife*, 2018, vol. 20, no. 7, art. e41215. <https://doi.org/10.7554/eLife.41215>
31. Wang J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2002, vol. 3, no. 6, pp. 430–440. <https://doi.org/10.1038/nrm831>
32. Salvador-Castell M., Golub M., Martinez N., Ollivier J., Peters J., Oger P. The first study on the impact of osmolytes in whole cells of high temperature-adapted microorganisms. *Soft Matter*, 2019, vol. 15, no. 41, pp. 8381–8391. <https://doi.org/10.1039/C9SM01196J>
33. Brininger C., Spradlin S., Cobani L., Evilia C. The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles. *Seminars in cell and developmental biology*. Academic Press, 2018, vol. 84, pp. 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.016>
34. Feller G. Protein folding at extreme temperatures: Current issues. *Seminars in cell and developmental biology*. Academic Press, 2018, vol. 84, pp. 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.003>
35. Bouwman A. S., Kennedy S. L., Müller R., Stephens R. H., Holst M., Caffell A. C., Roberts C. A., Brown T. A. Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no. 45, pp. 18511–18516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209444109>
36. Baker L., Brown T., Maiden M. C., Drobniowski F. Nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, vol. 10, no. 9, pp. 1568–1577. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040046>
37. Becq J., Gutierrez M. C., Rosas-Magallanes V., Rauzier J., Gicquel B., Neyrolles O., Deschavanne P. Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, vol. 24, no. 8, pp. 1861–1871. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm111>

**Информация об авторах**

*Слизень Вероника Вячеславовна* – канд. мед. наук, доцент, докторант. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: veronal@tut.by. <https://orcid.org/0000-0003-1846-6100>

*Суркова Лариса Константиновна* – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом. Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии (Долгиновский тракт, 157, 220080, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: niipulm@tut.by

*Гуревич Геннадий Львович* – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор. Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии (Долгиновский тракт, 157, 220080, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: niipulm@tut.by. <https://orcid.org/0000-0001-5683-2322>

**Information about the authors**

*Veronika V. Slizen* – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Doctoral Candidate. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veronal@tut.by. <https://orcid.org/0000-0003-1846-6100>

*Larissa K. Surkova* – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: niipulm@tut.by

*Gennady L. Gurevich* – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: niipulm@tut.by. <https://orcid.org/0000-0001-5683-2322>