

УДК 577.124

ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К L-АРАБИНОЗЕ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ AraR ОТРИЦАТЕЛЬНО РЕГУЛИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ *Mycobacterium smegmatis* К ИЗОНИАЗИДУ*

© 2019 L. Zhou¹, Z.-G. He¹, W. Li^{1,2**}

¹ National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; E-mail: lwahlbx@163.com

² State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

Поступила в редакцию 09.09.2018

После доработки 06.01.2019

Принята к публикации 24.01.2019

L-Арабиноза является важным компонентом клеточной стенки микобактерий. Она участвует в синтезе арабиногалактана и арабинозы, маннозы и других сахаров, что оказывает влияние на проницаемость клеточной стенки и лекарственную устойчивость. Однако до сих пор неясно, может ли L-арабиноза действовать в качестве эффективной молекулы, влияющей на устойчивость микобактерий к антибиотикам. Также не выяснен регуляторный механизм, определяющий ее действие. В настоящей работе нами был охарактеризован новый транскрипционный фактор AraR из *Mycobacterium smegmatis*, который реагирует на L-арабинозу и регулирует чувствительность микобактерий к изониазиду (INH). Было показано, что AraR специфически распознает два консервативных мотива длиной 15 п.н. в вышележащем регуляторном участке арабинозного оперона, обозначаемого как *araR*-оперон. AraR функционирует как репрессор транскрипции и осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии оперона. В отличие от действия AraR, сверхэкспрессия *araR*-оперона способствует развитию устойчивости микобактерий к INH. Поразительно, что L-арабиноза может действовать в качестве эффективной молекулы и приводить к дерепрессии ингибирования транскрипции AraR. Штамм с нокаутом AraR был более устойчив к INH, чем штамм дикого типа, в то время как штамм со сверхэкспрессией AraR был более чувствителен к препарату. Добавление в среду L-арабинозы может значительно повышать устойчивость штамма дикого типа, но не оказывает влияние на штамм с нокаутом гена *AraR*. Таким образом, в настоящей работе был выявлен новый фактор транскрипции, чувствительный к L-арабинозе, и установлена регуляция его активности при возникновении устойчивости бактерий к антибиотикам. Эти результаты дают ключ к дальнейшему пониманию механизма регуляции с участием молекул сахаров и ее взаимосвязи с лекарственной устойчивостью микобактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: AraR, микобактерии, L-арабиноза, устойчивость к антибиотикам.

DOI: 10.1134/S0320972519050087

В последние годы широкое распространение различных бактерий, устойчивых к антибиотикам, продолжает угрожать здоровью человека. По данным на 2016 г., в мире от туберкулеза, вызванного *Mycobacterium tuberculosis*, страдали 10,4 млн человек [1]. Ситуация с туберкулезной инфекцией усложнилась в связи с тем, что постоянно образуются новые штаммы возбудителя со множественной лекарственной устойчи-

востью [2]. Необходимо как можно скорее выявить регуляторные механизмы, лежащие в основе бактериальной лекарственной устойчивости, для последующей разработки новых противотуберкулезных препаратов.

Ранее были опубликованы работы, посвященные исследованию механизмов, обуславливающих возникновение устойчивости микобактерий к действию антибиотиков. У бактерий

Принятые сокращения: AG – арабиногалактан; AraR – транскрипционный фактор из *Mycobacterium smegmatis*; CFU – колониеобразующие единицы; EMSA – анализ сдвига электрофоретической подвижности; FITC – флуоресцеин изотиоцианат; INH – изониазид; LAM – липоарабиноманнан; RT-PCR – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; qRT-PCR – количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией; WT – дикий тип.

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (Link.springer.com), том 84, вып. 5, 2019.

** Адресат для корреспонденции.

широко распространены клеточные стенки, ассоциированные с природными насосами и транспортерами. Эти насосы поддерживают клеточный гомеостаз и регулируют трансмембранный транспорт лекарственных препаратов [3]. Показано, что у микобактерий некоторые из этих транспортеров или откачивающих насосов способствуют повышению устойчивости к изониазиду (INH), рифампицину, тетрациклину и другим токсичным соединениям [4–6]. В частности, миколовые кислоты являются основными компонентами клеточной стенки микобактерий, в значительной степени обеспечивающими непроницаемость и устойчивость к антибиотикам [7, 8]. Изменения компонентов клеточной стенки могут приводить к снижению проницаемости для препаратов, поступающих в клетку. Примером может служить *virS*-регулируемая монооксигеназа MymA клеточной стенки, которая поддерживает синтез миколовой кислоты и повышает целостность клеточной стенки. Мутации в *virS*–*mymA* приводят к увеличению проницаемости клеточной стенки и диффузии препаратов внутрь клетки [9, 10]. У *Mycobacterium smegmatis* фосфатаза фосфолипидов Ms6402 регулирует синтез D-арабинозы, а также арабиногалактана (AG). Изменение уровня экспрессии Ms6402 влияет на устойчивость микобактерий или чувствительность к противотуберкулезным препаратам [11]. Кроме того, блокирование взаимодействий лекарств и белков-мишеней и модификация самого препарата либо его непосредственной мишени также приводят к формированию лекарственной устойчивости [12, 13]. Например, метилтрансфераза Rv0560c может напрямую модифицировать лекарственные препараты, что, в конечном итоге, приводит к возникновению устойчивости *M. tuberculosis* к антибиотикам [14].

В качестве модельного штамма для исследования механизмов регуляции транскрипции вирулентных видов микобактерий была использована *M. smegmatis*, являющаяся непатогенной микобактерией. Уникальная структура клеточной стенки микобактерий наделяет их способностью противостоять суровым условиям окружающей среды и, в то же время, обеспечивает их устойчивость к различным антибиотикам [15]. L-Арабиноза является второй по распространенности альдопентозой после ксилозы у растений, а также важным компонентом клеточной стенки различных микроорганизмов, влияющим на широкий спектр физиологических процессов бактерий. В качестве важного компонента клеточной стенки микобактерий L-арабиноза участвует в синтезе AG, липоарабиноманнана (LAM) и других сахаров, оказывает существен-

ное влияние на проницаемость клеточной стенки и лекарственную устойчивость [16, 17].

В целом метаболизм L-арабинозы у многих видов бактерий регулируется арабинозным опероном [18, 19]. У *Bacillus subtilis* гены *araA*, *araB* и *araC* кодируют изомеразу L-арабинозы, L-рибулокиназу, регулятор и L-рибулоза-5-фосфат-4-эпимеразу соответственно. Продукты генов *araN*, *araP* и *araQ* представляют собой транспортные системы, зависящие от связывания с белками [18]. У *Escherichia coli* арабинозный оперон включает в себя: *AraA* (изомеразы), *AraB* (рибулокиназа), *AraC* (регулятор), *AraD* (эпимераза) и *AraEFGH* (транспортер для поглощения L-арабинозы) [19]. В большинстве случаев у бактерий экспрессия арабинозного оперона используется для утилизации L-арабинозы. Однако нет ответа на вопрос о том, связан ли арабинозный оперон с устойчивостью к антибиотикам.

В последние годы выявлена взаимосвязь между регуляцией транскрипции генов, связанных с синтезом клеточной стенки, и лекарственной устойчивостью микобактерий [20, 21]. Однако оставалось неизвестным, может ли L-арабиноза выступать в качестве эффективной молекулы, и каким образом она играет роль в иницировании механизма регуляции лекарственной устойчивости микобактерий. В настоящей работе нами был охарактеризован в клетках *M. smegmatis* новый отвечающий на L-арабинозу фактор транскрипции AraR, который регулирует экспрессию арабинозного оперона и чувствительность к антибиотикам. Полученные нами результаты могут способствовать пониманию механизма формирования устойчивости микобактерий к действию антибиотиков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды, ферменты, реагенты. Штамм *Escherichia coli* BL21 и вектор pET28a были приобретены у компании «Novagen», Германия (табл. S1 Приложения); ДНК-лигаза T4, ДНК-полимераза, dNTP и все ферменты рестрикции – у «TaKaRa Biotech», Япония. Праймеры для ПЦР были синтезированы в компании «Tsingke», Китай (табл. S2 Приложения).

Клонирование гена, экспрессия и очистка рекомбинантного белка AraR. Ген *araR* и другие родственные гены из геномной ДНК *M. smegmatis* mc²155 были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием эффективных праймеров (табл. S2 Приложения). Эти гены были клонированы в экспрессионные векторы pET28a и pMV261. Для экспрессии рекомбинантного белка плазмидой pET28a-*araR* трансформирова-

ли клетки штамма BL21 *E. coli*. Экспрессионные штаммы культивировали в среде LB при 37 °С до достижения OD_{600} 0,6. Затем в культуру добавляли 0,3 мМ изопропил-в-D-1-тиогалактопиранозид, и штаммы культивировали в течение 6 ч при 25 °С. Клетки собирали, белки очищали на Ni^{2+} -аффинных колонках, как описано ранее [22]. Элюат диализовали в течение ночи и хранили при –80 °С.

Бактериальный одногибридный анализ. Бактериальный одногибридный анализ проводили, как описано ранее [23]. Комбинированный промотор *araR* клонировали в вектор pVXcmT, *araR* – в вектор pTRG («Stratagene», США). Селективная среда для скрининга методом бактериального одногибридного анализа в планшете содержала 16 мкг/мл стрептомицина, 15 мкг/мл тетрациклина, 34 мкг/мл хлорамфеникола, 30 мкг/мл канамицина и 20 мМ 3-АТ (3-амино-1,2,4-триазол).

Анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). Субстраты ДНК для проведения анализа амплифицировали с помощью ПЦР с геномной ДНК *M. smegmatis* mc²155 с использованием эффективных праймеров или праймеров, синтезированных в компании «Tsingke», Китай (табл. S2 Приложения). Фрагмент ДНК метили FITC для проведения конкурентного анализа ДНК. Реакционная смесь (20 мкл) содержала Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl; белок; фрагмент ДНК; ddH₂O и 2,5% глицерина. Субстраты ДНК инкубировали совместно с белком при комнатной температуре в течение 25 мин. Затем смеси подвергали нативному электрофорезу в 5%-ном ПААГ. Результаты электрофореза визуализировали с помощью сканера Turphoon («GE Healthcare»).

Имунопреципитация хроматина. Анализ иммунопреципитации хроматина (ChIP) проводили, как описано ранее, с некоторыми изменениями [24]. Клетки *M. smegmatis* mc²155 выращивали до достижения $OD_{600} \sim 1,0 \dots 1,2$ в 100 мл среды 7H9. Затем клетки фиксировали в 1%-ном формальдегиде в течение 30 мин. Процесс фиксации останавливали добавлением 0,125 М глицина на 5 мин. Клетки собирали и ресуспендировали в 1 мл Tris-буфера (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,1% Tween 20; 0,1% Triton X-100). Затем клетки подвергали обработке ультразвуком на льду, центрифугировали и собирали супернатант. К образцам добавляли специфические антитела или преиммунную сыворотку при покачивании в течение 3 ч при 4 °С. Иммунопреципитацию образовавшихся комплексов проводили с помощью 20 мкл 50%-ной белок А-агарозы в течение 1 ч при 4 °С. Иммунные комплексы осаждали центрифугированием и ресуспендиро-

вали в 100 мкл TE-буфера (20 мМ Tris-HCl, pH 7,8; 10 мМ ЭДТА; 0,5% SDS). Затем комплексы разрушали в течение 6 ч при 65 °С. Образцы ДНК исходных образцов и преципитированных антителами комплексов хроматина очищали и анализировали с помощью ПЦР.

Футпринтинг с использованием ДНКазы I. Промоторную область *araR*-оперона длиной 399 п.н. амплифицировали методом ПЦР с использованием эффективных праймеров, меченных FITC. Амплифицированный продукт очищали с помощью набора для очистки ДНК («BioFlux») и затем подвергали связыванию с белком, как и в случае EMSA. Более подробно этот метод был описан ранее [25] и выполнен с некоторыми изменениями. Все реакционные смеси были подвергнуты расщеплению ДНКазой I (1 ед; «Fermentas China Co.», Китай) в течение 3 мин при 37 °С. Полученные данные анализировали с использованием ДНК-анализатора 37030XL фирмы «Applied Biosystems» (произведен компанией «Tsingke», Китай).

Количественная ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Выделение мРНК из клеток Msm/pMV261, Msm/pMV261-*araR*, Msm/WT и Msm/*araR::hyg* проводили с помощью набора RNApure Kit («Zomanbio», Китай) согласно инструкции производителя. При проведении ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction) использовали геноспецифичные праймеры (табл. S2 Приложения), кДНК первой цепи синтезировали с помощью набора RT-PCR Kit («Aidlab», Китай) согласно инструкции производителя. Количественную ПЦР в реальном времени (qPCR – quantitative real-time PCR) проводили, используя 20 мкл реакционной смеси, состоявшей из 10 мкл 2× SYBR qPCR Mix Kit («Aidlab», Китай), 200 нМ каждого праймера и 2 мкл образца кДНК из RT-PCR. Каждую реакцию проводили 3 раза. Амплификацию и обнаружение продуктов осуществляли с помощью прибора CFX96 («Bio-Rad», США) согласно следующему протоколу: 95 °С – 5 мин, затем 40 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 45 с; кривая плавления 55–99 °С, шаг 0,5 °С за 10 с; 25 °С – 5 мин. Полученные данные анализировали с помощью CFX Manager, версия 2.1 («Bio-Rad», США). Специфичность амплификации оценивали путем анализа кривой плавления. Уровни экспрессии генов нормализовали относительно уровня транскриптов гена *sigA* [26]. Степень изменения уровня экспрессии рассчитывали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [27]. Для статистической обработки полученных результатов использовали двусторонний критерий Стьюдента.

Анализ активности β -галактозидазы. Определение активности β -галактозидазы проводили с целью выявления регуляторной активности AraR. Нами были сконструированы рекомбинантные плазмиды pMV261-Ms1712p-*lacZ* и pMV261-Ms6769p-*lacZ*, которыми были трансформированы штаммы дикого типа и мутантный штамм Δ *araR*. Все штаммы выращивали в среде 7Н9 при 37 °С до достижения OD₆₀₀ 0,8–1,2. Измерение активности β -галактозидазы проводили, как описано ранее [28].

Построение кривых роста микобактерий и изучение влияния антибиотиков на рост микобактерий. Штаммы с рекомбинантным геном *araR* выращивали в среде 7Н9 при 37 °С до значений OD₆₀₀ 1,5–1,7. Затем каждую культуру разводили в 100 мл свежеприготовленной среды 7Н9, содержащей INH и L-арабинозу. Исходное значение OD₆₀₀ составляло 0,1. Далее культуры инкубировали при 37 °С и покачивании (160 об/мин). В различные моменты времени на планшеты наносили последовательные разведения образцов для определения CFU (colony-forming units). Аликвоты отбирали в указанные моменты времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

AraR осуществляет отрицательную модуляцию чувствительности *M. smegmatis* к изониазиду. Используя стратегию, сходную с опубликованной ранее [29], нами был проведен скрининг библиотеки экспрессируемых регуляторных факторов *M. smegmatis*. Эта библиотека содержит ~500 факторов транскрипции, каждый из которых повышенно экспрессируется под сильным промотором *hsp60* [29]. Был успешно выделен фактор транскрипции, входящий в семейство LacI и кодируемый геном *Ms1708*, и обозначен как AraR (рис. S1 Приложения). Как показано на рис. 1, *a*, штамм со сверхэкспрессией *araR* при помещении на планшет был более чувствителен к INH в сравнении со штаммом дикого типа, содержащим пустую плазмиду pMV261 (рис. 1, *a*, нижняя панель). Поэтому можно предположить, что сверхэкспрессия *araR* вызывает ингибирование роста рекомбинантного штамма микобактерий на планшете, содержащем INH.

Далее мы построили кривые роста микобактерий и получили подтверждение регуляторного влияния AraR на чувствительность *M. smegmatis* к INH. Так, были впервые получены мутантный штамм с делецией гена *araR* (*Msm araR::hyg/pMV261*) и комплементарный ему штамм (*Msm araR::hyg/pMinD-araR*). Как показано на рис. S2 Приложения, в отсутствие препарата не было

выявлено каких-либо заметных различий в кривых роста этих штаммов. В то же время при добавлении 6 мкг INH в культуральную среду рост штамма со сверхэкспрессией *araR* замедлялся в сравнении с контрольным штаммом дикого типа, тогда как в этих условиях рост мутантного штамма с делецией гена *araR* (*Msm araR::hyg/pMV261*) значительно улучшался (рис. 1, *b*).

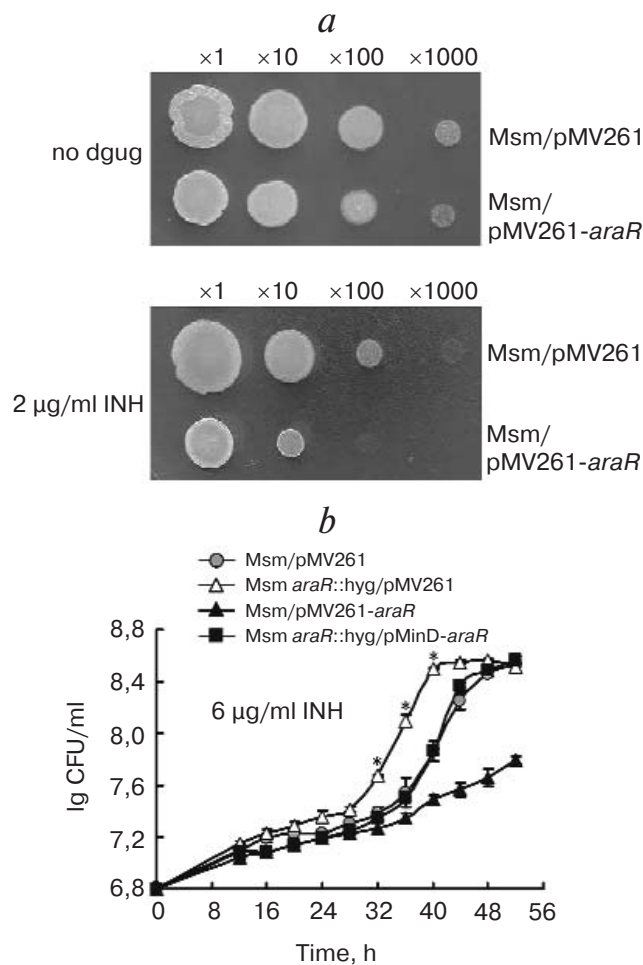


Рис. 1. AraR опосредует чувствительность *M. smegmatis* к изониазиду (INH). *a* – Чувствительность к INH штамма со сверхэкспрессией *araR*. Клетки штамма со сверхэкспрессией *araR* и штамма дикого типа разводили последовательно в 10 раз с получением четырех концентраций, равные количества клеточной культуры помещали в ячейки планшета 7Н10 в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии 2 мкг/мл INH (нижняя панель); *b* – определение влияния AraR на чувствительность клеток *M. smegmatis* к INH. Штаммы *M. smegmatis* с повышенной экспрессией *araR*, с удаленным геном *araR* и его комплементарные штаммы культивировали в среде 7Н9 и определили кривые их роста. Столбик ошибок представляют собой стандартное отклонение (SD) при трех биологических повторах; * $p \leq 0,05$ (статистически значимые различия между рекомбинантными штаммами и штаммами дикого типа)

Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, AraR осуществляет отрицательную модуляцию чувствительности клеток *M. smegmatis* к INH.

Экспрессия *araR*-оперона вносит вклад в устойчивость микобактерий к изониазиду. Ген *araR* локализован в вышележащем участке кластера генов Ms1708–1715 генома *M. smegmatis*, который обозначается как *araR*-оперон (рис. 2, *a*), кодирующий оперон арабинозы. Чтобы проанализировать регуляторный путь, с помощью которого AraR оказывает влияние на устойчивость к INH, нами был сконструирован штамм со сверхэкспрессией *araR*-оперона кластера генов (Msm/pMV261-Ms1709–1715) и проведено сравнение роста клеток этого штамма и штамма дикого типа в присутствии и в отсутствии препарата. Как показано на рис. 2, *b*, число колоний штамма со сверхэкспрессией кластера генов превышало (статистически значимые различия) число колоний штамма дикого типа в три различных момента времени (28, 32 или 36 ч) при добавлении в культуральную среду 6 мкг INH

(рис. 2, *b*, правая панель). В то же время не было обнаружено различий в росте этих двух штаммов при культивировании в отсутствие INH (рис. 2, *b*, левая панель).

В целом повышенная экспрессия *araR*-оперона вносит вклад в устойчивость микобактерий к INH, что прямо противоположно действию AraR.

AraR специфически связывается с вышележащей последовательностью *araR*-оперона. Обратный эффект регулятора AraR на его оперон предполагает, что AraR оказывает прямое регулирующее действие на экспрессию *araR*-оперона. Чтобы проверить это предположение, мы сначала с помощью метода бактериального одногибридного анализа изучили возможность связывания AraR с вышележащей регуляторной последовательностью длиной 399 п.н. (Ms1712p) между Ms1712 и Ms1713. Как показано на рис. 3, *a*, штамм, служащий в качестве положительного контроля, продемонстрировал активный рост, однако штамм, использующийся в качестве отрицательного контроля, и самоактивирующийся

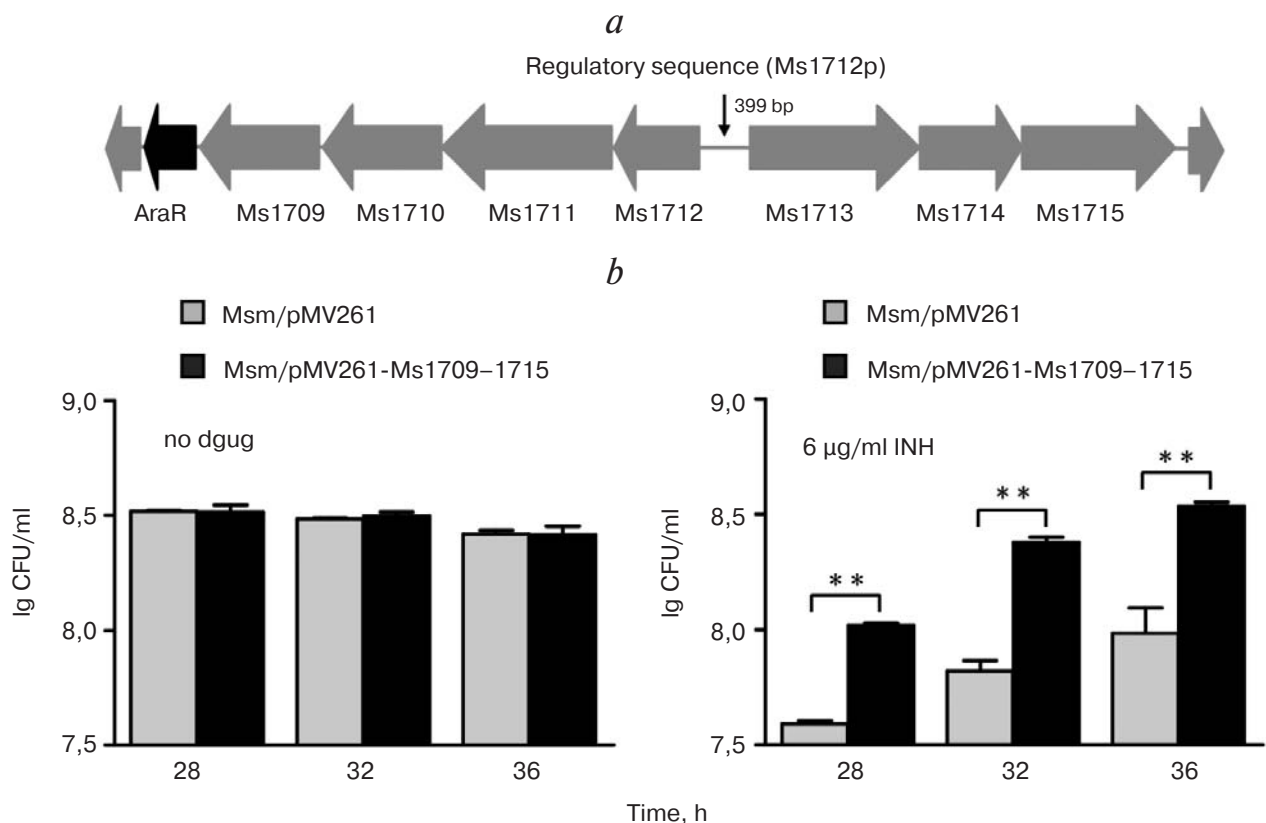


Рис. 2. Влияние генов *araR*-оперона на чувствительность микобактерий к изониазиду (INH). *a* – Распределение *araR* и соседних к нему генов в геноме *M. smegmatis*; *b* – влияние сверхэкспрессии генов *araR*-оперона на устойчивость клеток *M. smegmatis* к действию INH. Число колоний определяли в три определенных момента времени (28, 32 и 36 ч) в присутствии 6 мкг/мл INH и в его отсутствии. Столбики ошибок представляют разброс значений, полученных в результате трех биологических повторов. Значения *p* были рассчитаны с использованием непарного двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента с помощью программы GraphPad Prism 5; ** *p* < 0,01 (статистически значимые различия между двумя группами)

ся контрольный штамм, содержащий либо AraR, либо только ДНК, не росли на среде, использованной для проведения скрининга. Это указывает на то, что репортерная система работает хорошо. Удивительно, но репортерный штамм, который содержал AraR и его ДНК-мишень (Ms1712p), продемонстрировали хороший рост на той же среде, что указывает на наличие взаимодействия AraR с промотором (Ms1712p)

арабинозного оперона. Затем мы подтвердили это наблюдение *in vivo* на клетках *M. smegmatis* с помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChIP). Как показано на рис. 3, *b*, мишень для действия белка AraR, промотор (Ms1712p), может специфически быть возвращена в нативное состояние с помощью антител против AraR (левая панель, дорожка 2). Напротив, промотор отрицательного контроля (Ms6769p) не может

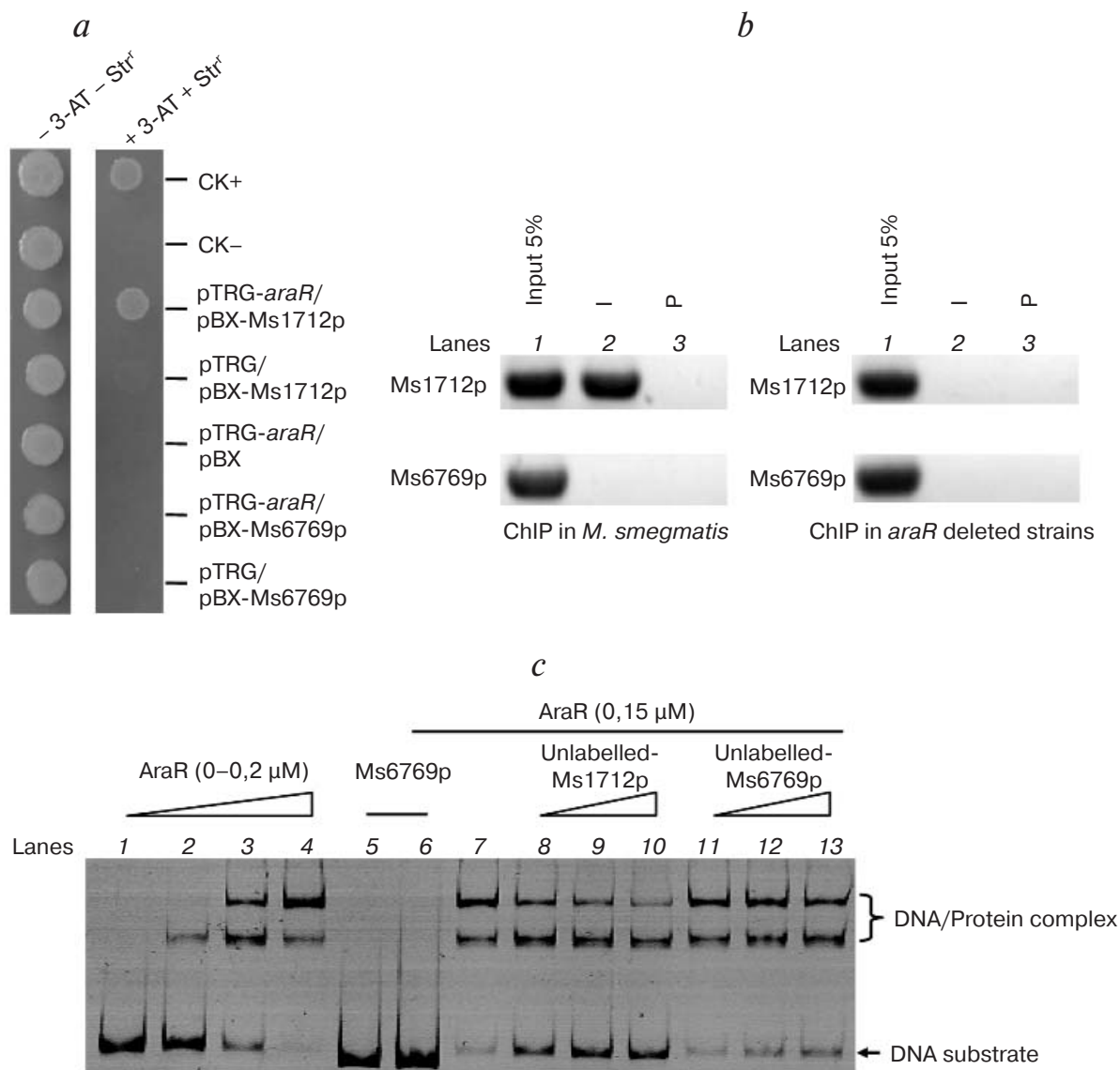


Рис. 3. Определение взаимодействия между AraR и Ms1712p. *a* – Бактериальный одногибридный анализ. Котрансформанты, содержащие плазмиды pTRG-*araR*/pBX-Ms1712p, продемонстрировали хороший рост на культуральной среде, использованной для проведения скрининга. Котрансформанты, содержащие плазмиды pTRG-Rv3133/pBX-Rv2031p (положительный контроль, СК+), также хорошо росли на этой среде, однако штамм, содержащий плазмиды pTRG/pBX, рос плохо (отрицательный контроль, СК-); *b* – иммунопреципитация хроматина (ChIP) с использованием преиммунной (P) или иммунной сыворотки (I), полученной против AraR. В качестве отрицательных контролей использовали штамм с делецией гена *araR* (правая панель) и промотор Ms6769p; *c* – определение сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). Специфическая ДНК-связывающая активность AraR относительно промоторной ДНК Ms1712p наблюдалась при инкубации Ms1712p ДНК-субстрата с увеличивающимися количествами AraR (дорожки 2–4). Немеченый Ms1712p (дорожки 8–10) конкурировал с меченым Ms1712p за связывание с белком AraR, в то время как немеченый Ms6769p конкурировать не смог (дорожки 11–13)

быть восстановлен в таких условиях. Кроме того, специфичность действия антител против AraR была подтверждена с помощью штамма с делецией AraR (правая панель).

Далее мы провели эксперименты по определению сдвига электрофоретической подвижности (EMSA), чтобы подтвердить связывание очищенного белка AraR с Ms1712p *in vitro*. Как показано на рис. 3, *c*, при инкубации увеличивающихся количеств AraR (0; 0,05; 0,1; 0,2 мкМ) с промотором-мишенью в геле наблюдается увеличение количества комплексов белка и ДНК (дорожки 1–4). Напротив, не наблюдалось образования комплексов белка с ДНК в случае негативного промотора Ms6769p (дорожка 6). Специфичность связывания AraR с Ms1712p также была подтверждена с помощью конкурентного метода. Удивительно, что немеченый Ms1712p может конкурентно ингибировать связывание AraR с меченым Ms1712p (дорожки 8–10), в то время как немеченый Ms6769p не ингибировал взаимодействие между AraR и его промотором (Ms1712p; дорожки 11–13).

В целом эти результаты свидетельствуют о том, что AraR может специфически связываться с вышележащим регуляторным участком арабинозного оперона.

AraR распознает консервативный мотив последовательности. Метод футпринтинга с использованием ДНКазы I был использован для картирования ДНК-мотива, с которым связывается AraR. Когда возрастающие количества белка AraR (0; 0,1; 0,2 мкМ) инкубировали с ДНКазой I и ДНК-субстратами (Ms1712p), два участка, содержащие последовательности GAATGTTAACGATCACATCT и TTCTGTGAGCGTTAACATCA, эффективно защищались белком AraR (рис. 4, *a*). Защищенные участки ДНК включали области –270...–289 и –125...–144 в цепи ДНК (рис. 4, *b*). Удивительно, но два связывающих участка содержали обратную комплементарную последовательность (ATGTTAACGCTCACA и TGTGAGCGTTAACAT). Это указывает на то, что AraR распознает специфически повторяющийся мотив последовательности в разных цепях ДНК. Дальнейшие исследования методом EMSA подтверждают значимость этого мотива для специфического распознавания белком AraR. Как показано на рис. 4, *c*, AraR не может связываться с укороченными фрагментами ДНК, в которых отсутствуют обратные комплементарные мотивы последовательности (дорожки 5–8 и 17–20). Напротив, AraR может связываться с укороченными фрагментами ДНК, которые содержат эти мотивы (дорожки 9–16 и 21–24).

В целом AraR может распознавать повторяющийся мотив длиной 15 п.н. (ATGTTAACGCT-

CACA), локализованный в вышележащем регуляторном участке арабинозного оперона.

AraR осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии арабинозного оперона. Обратный эффект регуляторного белка AraR на его оперон означает, что AraR осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии *araR*-оперона. Чтобы подтвердить это предположение, мы сначала сконструировали ряд плазмид, экспрессирующих только *lacZ* или промотор *lacZ*, и измерили активность β-галактозидазы. Плазида с сильным промотором *hsp60* была использована в качестве положительного контроля (СК+). Как показано на рис. 5, *a* в сравнении с беспромоторной плазмидой (СК–), экспрессия *lacZ* была сильной, что указывает на хорошую работу репортерной системы. Интересно, что экспрессия *lacZ* была значительно повышена в мутантном штамме *M. smegmatis* с делецией гена *araR* в сравнении со штаммом дикого типа, который содержал целевой промотор (Ms1712p). Не было выявлено значимых различий между штаммом дикого типа *M. smegmatis* и мутантным штаммом с делецией гена *araR*, содержащим неродственный промотор (Ms6769p). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что AraR осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии *araR*-оперона. Дальнейшие подтверждения этого вывода получены с помощью RT-qPCR. Как показано на рис. 5, *b*, уровень экспрессии арабинозного оперона (Ms1707, Ms1709–1714) был значительно повышен ($p < 0,05$) в мутантном штамме с делецией гена *araR* в сравнении со штаммом дикого типа.

В целом AraR функционирует в качестве ингибитора и осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии арабинозного оперона у *M. smegmatis*.

L-Арабиноза ингибирует активность AraR. AraR регулирует экспрессию генов, ассоциированных с метаболизмом арабинозы, что подразумевает способность AraR к ответу на сигнал, опосредованный арабинозой. Для проверки этого предположения нами методом EMSA была изучена возможность L-арабинозы оказывать влияние на ДНК-связывающую активность AraR. Как показано на рис. 6, *a*, при добавлении возрастающих количеств L-арабинозы (0, 1, 2 и 4 мМ) в реакционные смеси при проведении EMSA отчетливо наблюдается соответствующее снижение количества сместившихся ДНК-субстратов (дорожки 6–8), что указывает на то, что L-арабиноза может ингибировать ДНК-связывающую активность AraR. В то же время не наблюдалось изменений в количестве сместившихся ДНК-субстратов (дорожки 10–12), когда в качестве потенциально эффективной молекулы использовалась D-ксилоза.

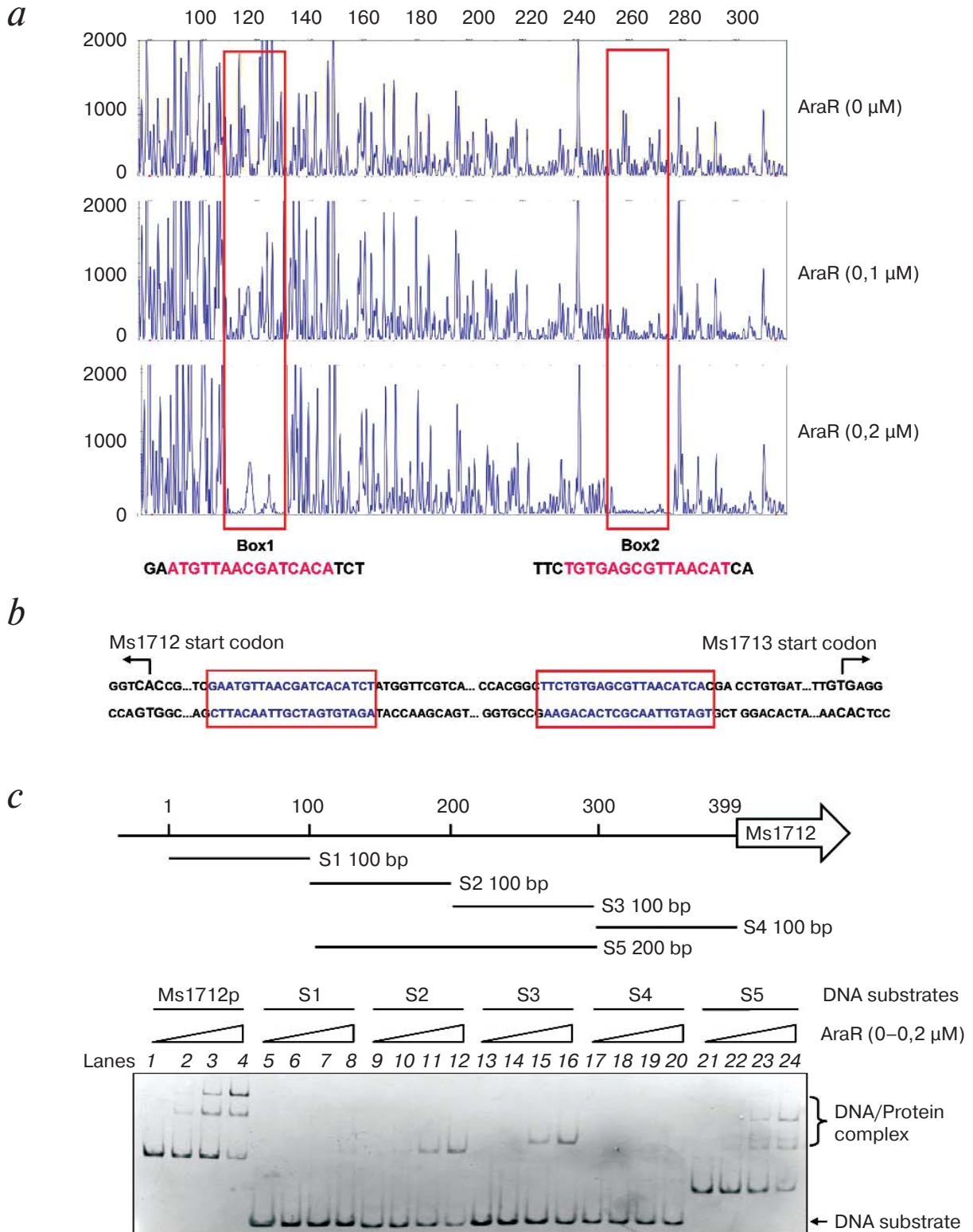


Рис. 4. Определение связывающего мотива последовательности для AraR внутри вышележащего участка оперона. *a* – Эксперименты по футпринтингу с ДНКазой I. Определяли степень защиты промотора Ms1712 от расщепления ДНКазой с помощью увеличивающихся количеств AraR (0–0,2 мкМ). Защищенные участки выделены красными рамками; *b* – характеристика последовательности и структуры защищаемого участка ДНК. Стартовый трансляционный кодон Ms1712 выделен жирным шрифтом; *c* – определение ДНК-связывающей активности AraR по отношению к ДНК-субстратам по сдвигу электрофоретической подвижности (EMSA) в присутствии или отсутствии мотива.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

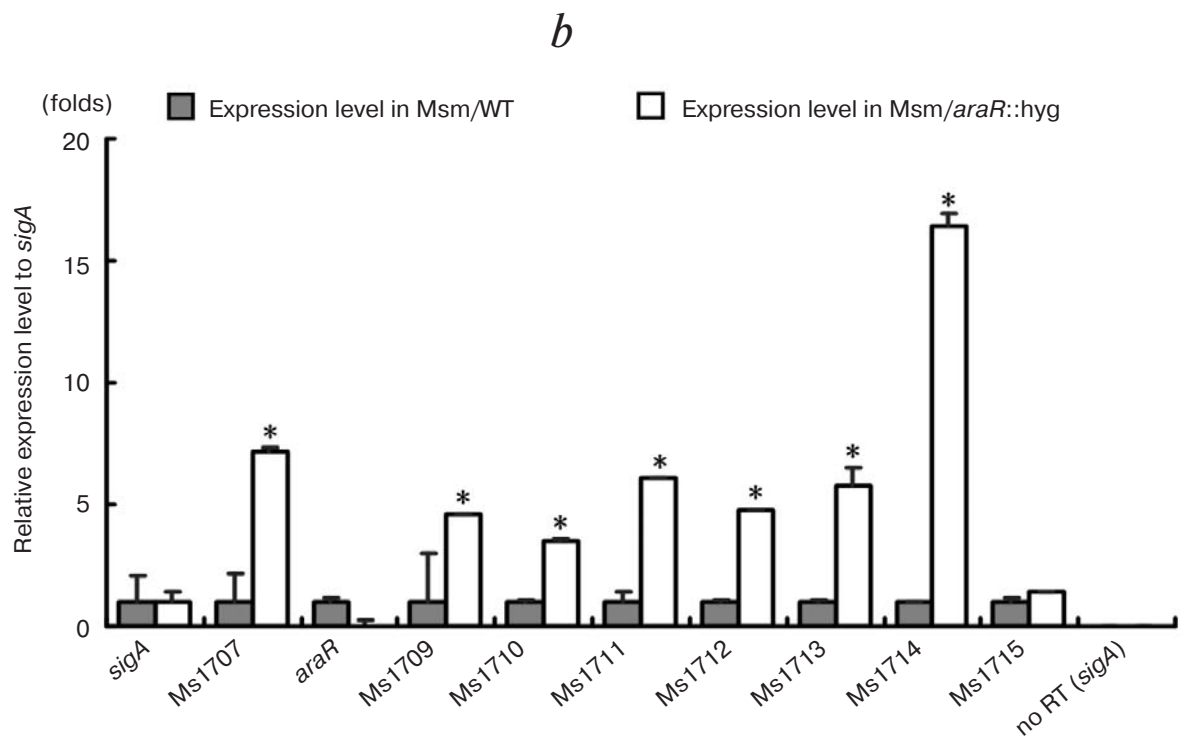
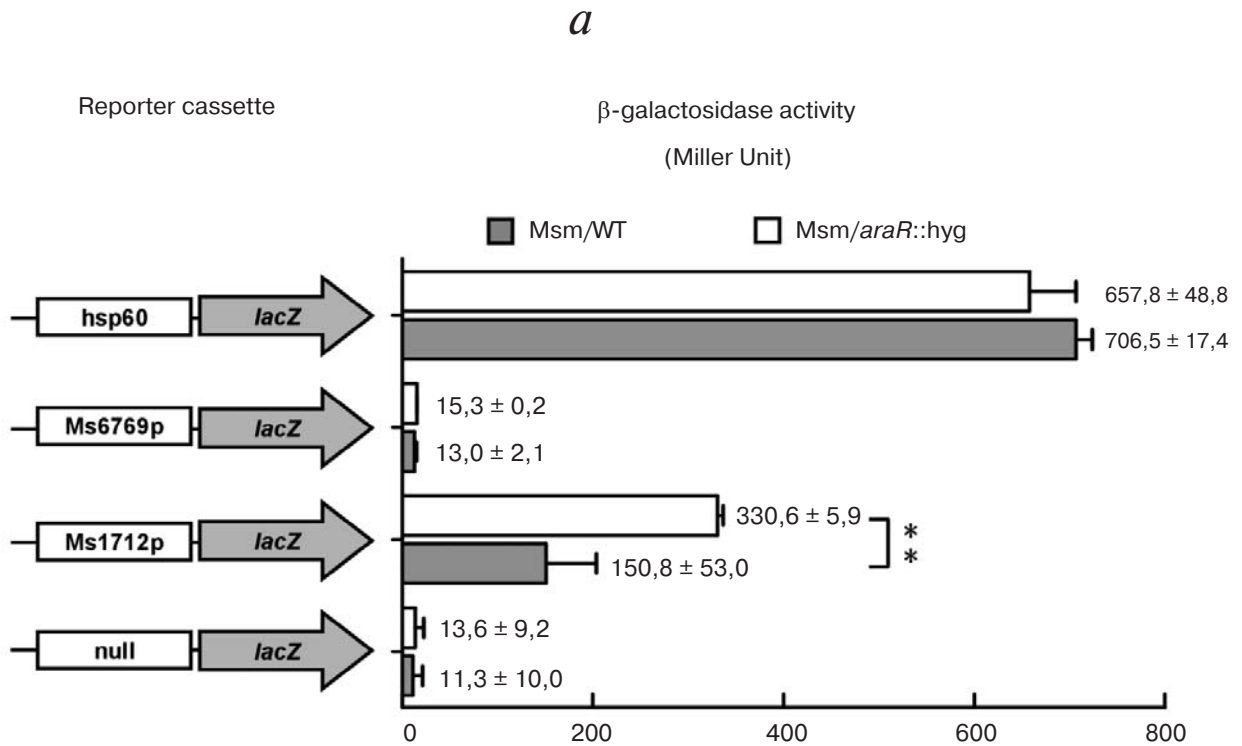


Рис. 5. Регуляторное влияние AraR на экспрессию *araR*-оперона. *a* – Определение активности β -галактозидазы. В качестве положительного контроля использовали *hsp60-lacZ*, в качестве отрицательных контролей – нулевой промотор *lacZ* (*null*) и *Ms6769p-lacZ*. Для штамма дикого типа и штамма с делецией гена *araR* была определена активность β -галактозидазы, которая приведена в виде единиц Миллера (правая панель). Столбики ошибок представляют разброс значений, полученных в результате трех биологических повторов; ** $p < 0,01$; *b* – результаты RT-qPCR. Уровни экспрессии генов нормализовали против гена *sigA* как инвариантного транскрипта. Столбики ошибок представляют разброс значений, полученных в результате трех биологических повторов; * $p \leq 0,05$ (статистически значимые различия между двумя группами)

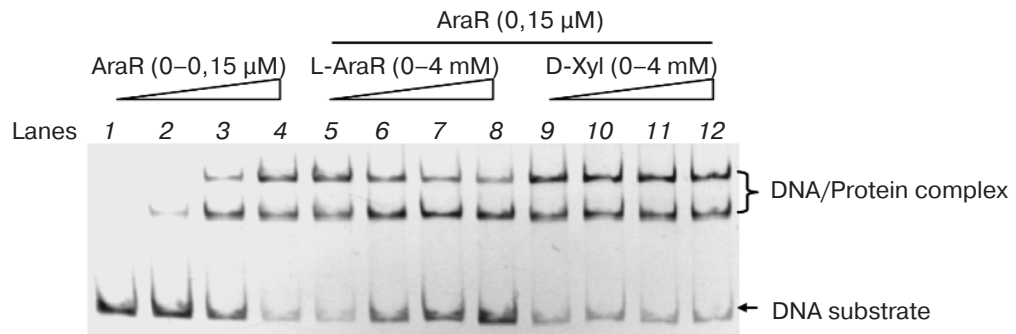
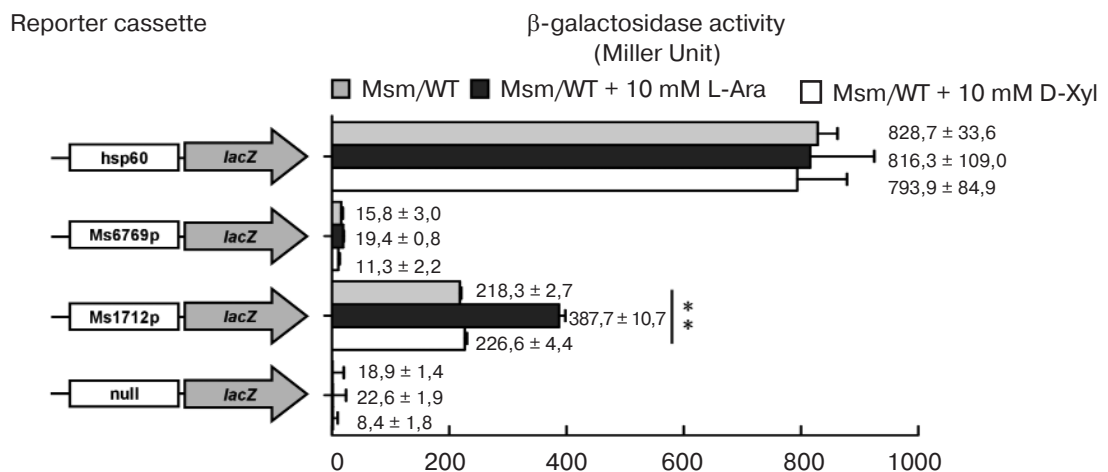
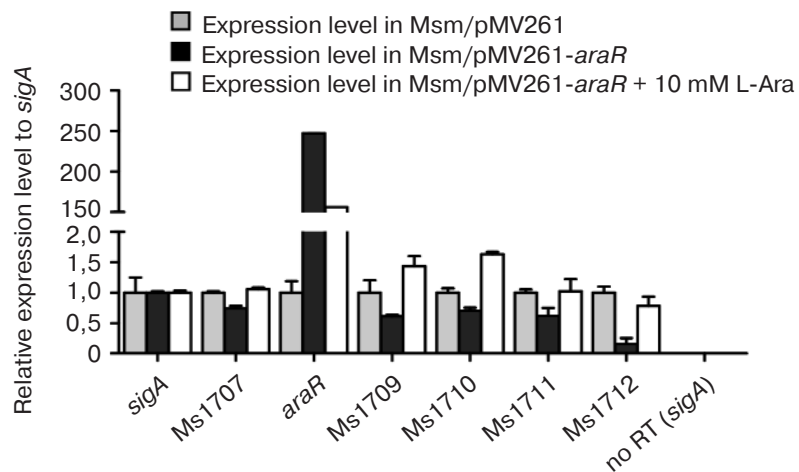
a**b****c**

Рис. 6. Влияние L-арабинозы на ДНК-связывающую активность и регуляцию AraR. *a* – Определение сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). FITC-меченный Ms1712p инкубировали с AraR (0,15 мкМ) в присутствии L-арабинозы (L-Ara; 0–4 мМ; дорожки 5–8) или D-ксилозы (D-Xyl; дорожки 9–12). Свободный ДНК-субстрат и комплекс «ДНК–белок» обозначены в правой части; *b* – определение активности β-галактозидазы в присутствии 10 мМ L-Ara или D-Xyl. В качестве положительного контроля использовали hsp60-lacZ, в качестве отрицательных контролей – нулевой промотор lacZ и Ms6769p-lacZ. Для штамма дикого типа и штамма с делецией гена araR была определена активность β-галактозидазы, которая приведена в виде единиц Миллера (правая панель). Столбики ошибок представляют разброс значений, полученных в результате трех биологических повторов; ** $p \leq 0,01$ (статистически значимые различия между двумя группами); *c* – результаты RT-qPCR. Штамм со сверхэкспрессией гена araR выращивали в среде 7H9 в присутствии 10 мМ L-Ara. Уровни экспрессии генов нормализовали против гена sigA как инвариантного транскрипта. Столбики ошибок представляют разброс значений, полученных в результате трех биологических повторов. ** $p < 0,05$ (статистически значимые различия между двумя группами)

Далее нами были получено подтверждение ингибирования L-арабинозой активности AraR с использованием метода определения активности β -галактозидазы. Как показано на рис. 6, *b*, рекомбинантные штаммы, содержащие плазмиды, экспрессирующие только *lacZ* или совместно промотор и *lacZ*, культивировались в трех различных средах в присутствии и в отсутствии L-арабинозы. Следует обратить внимание, что при культивировании клеток в среде с 10 мМ L-арабинозой экспрессия *lacZ* была значительно повышена в штамме дикого типа, но не в мутантном штамме с удаленным геном *araR* (рис. S3 Приложения). При росте в среде с добавлением 10 мМ D-ксилозы изменений не наблюдалось (рис. 6, *b*). Эти результаты свидетельствуют о том, что арабиноза специфически ингибирует активность AraR.

Этот вывод далее был подтвержден с помощью метода RT-qPCR. Как показано на рис. 6, *c*, уровень экспрессии генов *araR*-оперона был значительно снижен у *Msm/pMV261-araR* в сравнении с *Msm/pMV261*. Однако снижение экспрессии генов-мишеней у *Msm/pMV261-araR* возвращалось в норму, когда в культуральную среду добавляли 10 мМ L-арабинозу. Эти результаты указывают на то, что арабиноза может нейтрализовать ингибиторную активность AraR. Напротив, D-ксилоза не проявляет такой регуляторной роли в тех же условиях.

Таким образом, L-арабиноза может выступать в качестве эффективного ингибитора активности фактора транскрипции AraR.

L-Арабиноза нейтрализует отрицательную регуляцию фактором транскрипции AraR чувствительности микобактерий к изониазиду. AraR осуществляет отрицательную модуляцию чувствительности клеток *M. smegmatis* к ИН, а L-арабиноза ингибирует активность AraR, что предполагает способность L-арабинозы к нейтрализации регуляторной роли AraR в устойчивости к ИН. Как показано на рис. 7, *a*, при добавлении ИН штамм дикого типа растет лучше (статистически значимые различия) в присутствии 10 мМ L-арабинозы, чем в присутствии D-ксилозы. В то же время не было обнаружено заметных различий в росте мутантного штамма с делецией гена *araR* в присутствии или в отсутствии L-арабинозы при добавлении ИН (рис. 7, *b*).

Эти результаты означают, что L-арабиноза может нейтрализовать отрицательную регуляцию фактором транскрипции AraR чувствительности микобактерий к ИН, что согласуется с нашей моделью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

L-Арабиноза является важным компонентом клеточной стенки микобактерий, вовлеченным в синтез AG и LAM [17, 30]. Однако до сих пор

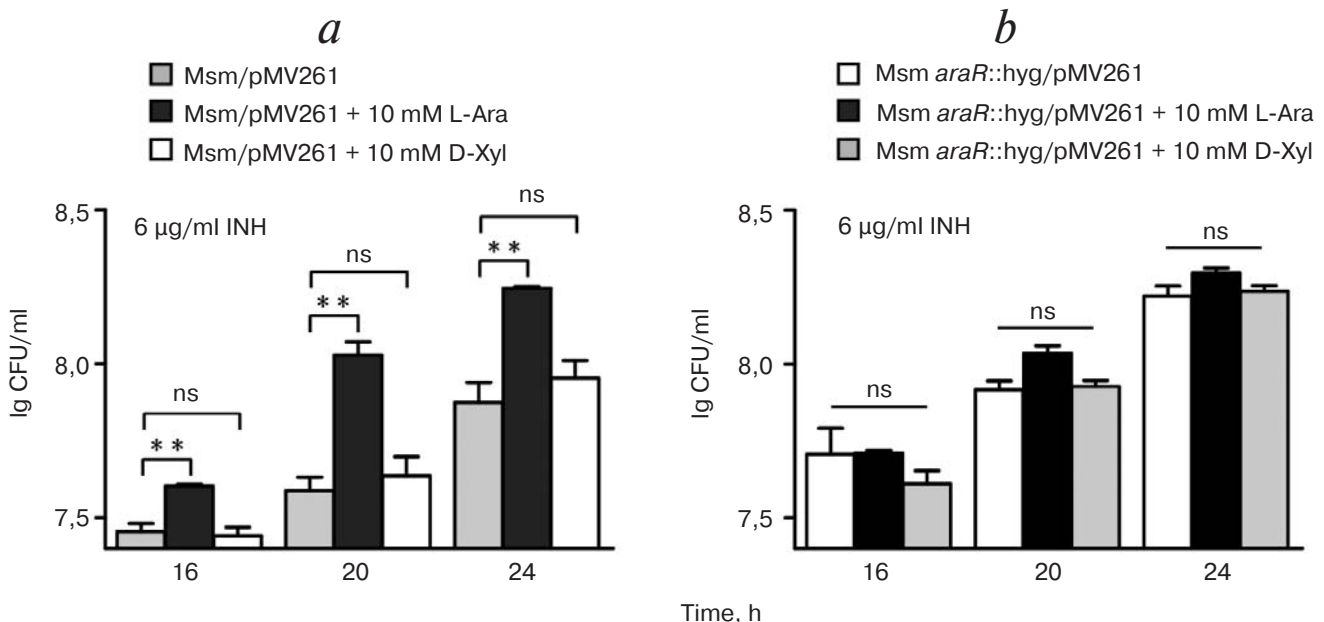


Рис. 7. Влияние L-арабинозы на чувствительность *M. smegmatis* к изониазиду (ИН). Штамм дикого типа (*a*) и штамм с делецией гена *araR* (*b*) выращивали на среде 7Н9 с добавлением 6 мкг/мл ИН в присутствии 10 мМ L-арабинозы (L-Ara) или D-ксилозы (D-Xyl). Число колоний определяли в три момента времени (16, 20 и 24 ч). Столбики ошибок представляют разброс значений, полученных в результате трех биологических повторов. ** $p < 0,01$ (статистически значимые различия между двумя группами); ns – отсутствие статистически значимых различий между двумя группами

неясно, способна ли L-арабиноза действовать в качестве эффективной молекулы, и может ли запускаемая сахарами регуляция оказывать влияние на лекарственную устойчивость микобактерий. В настоящей работе нами был охарактеризован белок AraR как новый отвечающий на L-арабинозу фактор транскрипции в клетках *M. smegmatis*. L-Арабиноза может действовать в качестве эффективной молекулы, способной отменять подавление ингибирования фактором транскрипции AraR экспрессии арабинозного оперона, принимающего участие в регуляции чувствительности микобактерий к ИН. Полученные в настоящей работе результаты предоставляют новую информацию, необходимую для понимания взаимосвязей между запускаемым арабинозой механизмом регуляции и формированием у микобактерий устойчивости к действию антибиотиков.

В последние годы во многих работах было показано, что сахара могут служить в качестве сигнальных молекул, участвующих в регуляции внутриклеточного метаболизма у различных видов бактерий. Например, в случае штамма *E. coli* O157:H7 в качестве сигнальной молекулы, участвующей в процессе регуляции *luxS*-ассоциированной экспрессии генов и влияющей на вирулентность бактерий, выступает глюкоза [31]. У *Bacillus subtilis* и *Caulobacter crescentus* опосредованный ксилозой сигнал может регулировать экспрессию многих генов через направленное воздействие на фактор транскрипции XylR [32, 33]. Интересно, что L-арабиноза может также выступать в качестве сигнальной молекулы, осуществляющей положительную регуляцию экспрессии генов метаболизма и транспорта L-арабинозы у *Corynebacterium glutamicum*, *E. coli* и *Bacillus subtilis* [19, 34, 35]. В то же время имеется лишь небольшое количество работ, посвященных функциям простых сахаров как сигнальных молекул в клетках микобактерий, и возможные сигнальные пути до сих пор не охарактеризованы. Несмотря на предположение о действии AraR в качестве вероятного отрицательного регулятора арабинозного оперона у *M. smegmatis* [36], необходимы дополнительные экспериментальные доказательства того, действительно ли AraR напрямую осуществляет регуляцию соответствующих генов и ответ на L-арабинозу. В настоящей работе был выявлен новый фактор транскрипции AraR, который в клетках *M. smegmatis* отвечает на опосредованный L-арабинозой сигнал и осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии арабинозного оперона. Это первая работа, в которой продемонстрирована роль L-арабинозы в качестве сигнальной молекулы у микобактерий.

Другим интересным результатом данной работы является тот факт, что запускаемый арабинозой механизм регуляции связан с формированием устойчивости микобактерий к действию антибиотиков. Как важный компонент клеточной стенки, L-арабиноза участвует в процессе синтеза AG и LAM, что может влиять на проницаемость клеточной мембраны у микобактерий. В настоящей работе нами было показано, что L-арабиноза может целенаправленно оказывать воздействие на активность AraR и далее регулировать экспрессию кластера генов транспорта ABC (Ms1709–1712), который включает в себя гены, ассоциированные с транспортом и метаболизмом L-арабинозы. AraR функционирует как репрессор транскрипции и осуществляет отрицательную регуляцию экспрессии оперона. Удивительно, что L-арабиноза способна подавлять транскрипционное ингибирование AraR. У *Corynebacterium glutamicum* AraR также действует как репрессор транскрипции генов *araBDA*, *araE* и *galM-araR*, а L-арабиноза снижает ДНК-связывающую активность AraR [34]. Эти результаты согласуются с нашими экспериментальными данными. Кроме того, полученные нами результаты также показывают, что регуляция в ряду «арабиноза – AraR – арабинозный оперон» связана с формированием устойчивости микобактерий к действию антибиотиков. До сих пор о подобных результатах для других бактерий не сообщалось.

Изониазид – один из препаратов первой линии при лечении туберкулеза. Фактически он является предшественником лекарственного средства, активируемым пероксидазой KatG. В результате активации образуется комплекс «INH–NAD», который ингибирует InhA, еноил-АСР-редуктазу системы синтазы жирных кислот II типа. Это приводит к ингибированию биосинтеза миколовой кислоты в клеточной стенке и к гибели бактериальной клетки [37]. К настоящему времени предложено несколько основных механизмов устойчивости микобактерий к действию ИН [38]. Например, было показано, что мутации в генах *katG* и *inhA* ассоциированы с устойчивостью к ИН [39, 40]. Оперон *iniBAC* кодирует у микобактерий гены, ассоциированные с выкачивающим насосом, и обеспечивает их устойчивость к ИН [41]. Он также имеет отношение к инактивации цитохрома P450, что приводит к возникновению устойчивости к действию ИН [42, 43]. Однако в настоящей работе не было обнаружено различий в уровне экспрессии генов, таких как *katG*, *inhA*, *iniBAC*, и цитохрома P450 у штамма со сверхэкспрессией гена *araR* и штамма дикого типа (рис. S4 Приложения). На этом основании можно предполо-

жить, что AraR осуществляет отрицательную регуляцию устойчивости клеток *M. smegmatis* к INH без участия описанных выше механизмов. Таким образом, результаты нашей работы могут способствовать пониманию механизма формирования устойчивости к антибиотикам у микобактерий.

В целом полученные нами данные свидетельствуют в пользу модели, согласно которой AraR в ответ на сигнал L-арабинозы способствует экспрессии арабинозного оперона и синтезу компонентов клеточной стенки, таких как AG и LAM [17, 30], вызывая тем самым изменения проницаемости клеточной стенки. В конечном итоге, все это влияет на устойчивость бактерий к изониазиду. Очевидно, что в будущем необходимо провести дополнительные исследования для выявления механизма, лежащего в основе регуляции формирования устойчивости к действию антибиотиков, запускаемой арабинозой. Тем не менее полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы в дальнейших работах, направленных на изучение запускаемого арабинозой процесса регуляции и выявление

механизма возникновения устойчивости к антибиотикам у микобактерий.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Национальной R&D программы Китая (National Key R&D Program of China; 2017YFD0500300), Национального фонда естественных наук Китая (National Natural Science Foundation of China; 31730005, 31670075 и 31870036) и Программы стажировок Chang Jiang (Chang Jiang Scholars Program; предоставлена Z.-G. He).

Вклад авторов. W. Li спланировал и координировал выполнение работы; L. Zhou и W. Li проводили эксперименты. Все авторы внесли вклад в интерпретацию результатов и формулировку выводов. W. Li, Z.-G. He и L. Zhou интерпретировали результаты и написали текст статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization (WHO) (2017) Global tuberculosis report 2017, World Health Organization, Geneva, p. 1.
- Fonseca, J.D., Knight, G.M., and McHugh, T.D. (2015) The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Infect. Dis.*, **32**, 94–100.
- Nguyen, L. (2016) Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update, *Arch. Toxicol.*, **90**, 1585–1604.
- Li, X.Z., Zhang, L., and Nikaido, H. (2004) Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 2415–2423.
- De Rossi, E., Ainsa, J.A., and Riccardi, G. (2006) Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance, *FEMS Microbiol.*, **30**, 36–52.
- Louw, G.E., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., McEvoy, C.R., Van Helden, P.D., and Victor, T.C. (2009) A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **53**, 3181–3189.
- Barry, C.E., and Mdluli, K. (1996) Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components, *Trends Microbiol.*, **4**, 275–281.
- Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., Jr., and Hatfull, G.F. (2008) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria, *Mol. Microbiol.*, **69**, 164–174.
- Singh, A., Jain, S., Gupta, S., Das, T., and Tyagi, A.K. (2003) mymA operon of *Mycobacterium tuberculosis*: its regulation and importance in the cell envelope, *FEMS Microbiol. Lett.*, **227**, 53–63.
- Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffre, A., Sabio Garcia, J., Morbidoni, H.R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A.A., and Biqi, F. (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Virulence*, **4**, 3–66.
- Jiang, T., Cai, L., Zhao, X., He, L., Ma, Y., Zang, S., Zhang, C., Li, X., and Xin, Y. (2014) Functional identification of MSMEG_6402 protein from *Mycobacterium smegmatis* in decaprenylphosphoryl-D-arabinose biosynthesis, *Microb. Pathog.*, **76**, 44–50.
- Andriole, V.T. (2005) The quinolones: past, present, and future, *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 113–119.
- Vetting, M.W., Hegde, S.S., Fajardo, J.E., Fiser, A., Roderick, S.L., Takiff, H.E., and Blanchard, J.S. (2006) Pentapeptide repeat proteins, *Biochemistry*, **45**, 1–10.
- Warrier, T., Kapilashrami, K., Argyrou, A., Ioerger, T.R., Little, D., Murphy, K.C., Nandakumar, M., Park, S., Gold, B., Mi, J., Zhang, T., Meiler, E., Rees, M., Somersan-Karakaya, S., Porras-De Francisco, E., Martinez-Hoyos, M., Burns-Huang, K., Roberts, J., Ling, Y., Rhee, K.Y., Mendoza-Losana, A., Luo, M., and Nathan, C.F. (2016) N-methylation of a bactericidal compound as a resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 4523–4530.
- Johnson, R., Streicher, E.M., Louw, G.E., Warren, R.M., van Helden, P.D., and Victor, T.C. (2006) Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **8**, 97.
- Belanger, A.E., Besra, G.S., Ford, M.E., Mikusova, K., Belisle, J.T., Brennan, P.J., and Inamine, J.M. (1996) The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11919–11924.
- Bhat, Z.S., Rather, M.A., Maqbool, M., Lah, H.U., Yousuf, S.K., and Ahmad, Z. (2017) Cell wall: a versatile

- fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biomed. Pharmacother.*, **95**, 1520–1534.
18. Sa-Nogueira, I., and Mota, L.J. (1997) Negative regulation of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *araR* (*araC*) gene, *J. Bacteriol.*, **179**, 1598–1608.
 19. Schleif, R. (2000) Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*, *Trends. Genet.*, **16**, 559–565.
 20. Sharma, K., Gupta, M., Pathak, M., Gupta, N., Koul, A., Sarangi, S., Baweja, R., and Singh, Y. (2006) Transcriptional control of the mycobacterial *embCAB* operon by PknH through a regulatory protein, EmrB, *in vivo*, *J. Bacteriol.*, **188**, 2936–2944.
 21. Li, W., and He, Z.G. (2012) LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in *Mycobacterium smegmatis*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11292–11307.
 22. Wang, Y., Huang, Y., Xue, C., He, Y., and He, Z.G. (2011) A ClpR-like regulator specifically recognizes a RecA-independent promoter motif and broadly regulates expression of DNA damage inducible genes in mycobacteria, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31159–31167.
 23. Guo, M., Feng, H., Zhang, J., Wang, W., Wang, Y., Li, Y., Gao, C., Chen, H., Feng, Y., and He, Z.G. (2009) Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system, *Genome Res.*, **19**, 1301–1308.
 24. Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001) Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation, *Genes Dev.*, **15**, 2069–2082.
 25. Li, W., Li, M., Hu, L., Zhu, J., Xie, Z., Chen, J., and He, Z.G. (2018) HpoR, a novel c-di-GMP effective transcription factor, links the second messenger's regulatory function to the mycobacterial antioxidant defense, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3595–3611.
 26. Moker, N., Brocker, M., Schaffer, S., Kramer, R., Morbach, S., and Bott, M. (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection, *Mol. Microbiol.*, **54**, 420–438.
 27. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$, *Methods*, **25**, 402–408.
 28. Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., and Hatfull, G.F. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines, *Nature*, **351**, 456–460.
 29. Rao, M., Liu, H., Yang, M., Zhao, C., and He, Z.G. (2012) A copper-responsive global repressor regulates expression of diverse membrane-associated transporters and bacterial drug resistance in mycobacteria, *J. Biol. Chem.*, **287**, 39721–39731.
 30. Brennan, P.J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis (Edinb)*, **83**, 91–97.
 31. Delcenserie, V., Lapointe, G., Charaslertrangsi, T., Rabalski, A., and Griffiths, M.W. (2012) Glucose decreases virulence gene expression of *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food. Prot.*, **75**, 748.
 32. Gartner, D., Degenkolb, J., Ripperger, J.A., Allmansberger, R., and Hillen, W. (1992) Regulation of the *Bacillus subtilis* W23 xylose utilization operon: interaction of the Xyl repressor with the xyl operator and the inducer xylose, *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 415–422.
 33. Stephens, C., Christen, B., Watanabe, K., Fuchs, T., and Jenal, U. (2007) Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor, *J. Bacteriol.*, **189**, 8828–8834.
 34. Kuge, T., Teramoto, H., Yukawa, H., and Inui, M. (2014) The LacI-type transcriptional regulator AraR acts as an L-arabinose-responsive repressor of L-arabinose utilization genes in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 31831, *J. Bacteriol.*, **196**, 2242–2254.
 35. Mota, L.J., Tavares, P., and Sa-Nogueira, I. (1999) Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **33**, 476–489.
 36. Takata, G., Poonperm, W., Rao, D., Souda, A., Nishizaki, T., Morimoto, K., and Izumori, K. (2007) Cloning, expression, and transcription analysis of L-arabinose isomerase gene from *Mycobacterium smegmatis* SMDU, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2876–2885.
 37. Vilcheze, C., and Jacobs, W.R., Jr. (2007) The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics, *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 35–50.
 38. Hazbon, M.H., Brimacombe, M., Bobadilla, del Valle, M., Cavatore, M., Guerrero, M.I., Varma-Basil, M., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Leon, C.I., Bose, M., Chaves, F., Murray, M., Eisenach, K.D., Sifuentes-Osornio, J., Cave, M.D., Ponce, de Leon, A., and Alland, D. (2006) Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2640–2649.
 39. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S.T. (1992) The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature*, **358**, 591–593.
 40. Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W.R., Jr. (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, **263**, 227–230.
 41. Colangeli, R., Helb, D., Sridharan, S., Sun, J., Varma-Basil, M., Hazbon, M.H., Harbacheuski, R., Megjugorac, N.J., Jacobs, W.R., Jr, Holzenburg, A., Sacchetti, J.C., and Alland, D. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol, *Mol. Microbiol.*, **55**, 1829–1840.
 42. Magliozzo, R.S., and Marcinkeviciene, J.A. (1996) Evidence for isoniazid oxidation by oxyferrous mycobacterial catalase-peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11303–11304.
 43. Wengenack, N.L., Lopes, H., Kennedy, M.J., Tavares, P., Pereira, A.S., Moura, I., Moura, J.J., and Rusnak, F. (2000) Redox potential measurements of the *Mycobacterium tuberculosis* heme protein KatG and the isoniazid-resistant enzyme KatG (S315T): insights into isoniazid activation, *Biochemistry*, **39**, 11508–11513.

**AraR, an L-ARABINOSE-RESPONDING
TRANSCRIPTION FACTOR, NEGATIVELY
REGULATES THE ISONIAZID RESISTANCE
OF *Mycobacterium smegmatis***

L. Zhou¹, Z.-G. He¹, and W. Li^{1,2*}

¹ National Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
College of Life Science and Technology, Huazhong
Agricultural University, Wuhan 430070, China;
E-mail: lwlbx@163.com

² State Key Laboratory for Conservation and Utilization
of Subtropical Agro-bioresources, College of Life Science
and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

Received September 9, 2018

Revised January 6, 2019

Accepted January 24, 2019

L-Arabinose is an important component of mycobacterial cell wall. It participates in synthesis of arabinogalactan and arabinose, mannose, and other sugars, which has a potential important influence on bacterial cell wall permeability and drug resistance. However, it remains unclear, whether L-arabinose can effectively modulate the mycobacterial antibiotic resistance, and what is the underlying regulatory mechanism. In this study, we characterized a new transcription factor AraR in *Mycobacterium smegmatis*, which responds to L-arabinose and regulates the mycobacterial isoniazid (INH) sensitivity. AraR was shown to specifically recognize two conserved 15-bp motifs within upstream regulatory region of an arabinose operon, designated as *araR* operon. AraR functions as a transcriptional repressor and negatively regulates expression of the operon. In contrast to the effect of AraR, the overexpression of *araR* operon contributes to the mycobacterial INH-resistance. Strikingly, L-arabinose can act as an effective molecule and reverse the transcriptional inhibition caused by AraR. The *araR* knockout strain was more resistant to INH than wildtype strain, whereas the *araR*-overexpressing strain was more sensitive to the drug. Addition of L-arabinose in culture medium can significantly enhance the INH resistance of the wildtype strain but not the *araR* knockout strain. Therefore, our study identified a new L-arabinose-responding transcription factor and elucidated its role in regulation of bacterial antibiotic resistance. These findings provide clues for further understanding of the regulatory role of sugar molecules in relation with drug resistance in mycobacteria.

Keywords: AraR, mycobacteria, L-arabinose, antibiotic resistance