



DOI: 10.22363/2313-2310-2024-32-1-41-50

EDN: GWENSS


УДК 504.7

Научная статья / Research article

Изучение механизма действия новых производных хиноксалин 1,4-диоксида на модельном объекте *Mycobacterium smegmatis*

А.А. Ватлин^{1,2}  , С.Г. Фролова¹, О.Б. Беккер¹, В.Н. Даниленко¹

¹ИОГен РАН, Москва, Российская Федерация

²Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация
 vatlin_alexey123@mail.ru

Аннотация. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) устойчивость к антибиотикам является сегодня одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человечества, продовольственной безопасности и развития, при этом одним из наиболее смертоносных бактериальных заболеваний остается туберкулез (ТБ). Основной проблемой лечения туберкулезной инфекции является возникновение штаммов с лекарственной устойчивостью (ЛУ) к 4–9 препаратам. Возникновение бактериальных штаммов с ЛУ является следствием недостаточной приверженности лечению пациентов, прерванного лечения, неправильно подобранного курса химиотерапии, а также, по последним данным, накопления антибиотиков в окружающей среде, которые могут приводить к активации природной системы лекарственной устойчивости у бактерий. Следствием ЛУ к антибиотикам являются продолжительные госпитализации, рост медицинских расходов и смертности в связи с чем стоит задача разрабатывать новые эффективные антибактериальные препараты, которые бы обладали новыми механизмами для снижения возникновения бактериальной устойчивости. В данной работе нами были изучены механизмы действия новых перспективных антимикобактериальных производных хиноксалин 1,4-диоксида на модельном объекте *Mycobacterium smegmatis*.

Ключевые слова: антибиотики, бактериальная устойчивость, микобактерии, туберкулез

Благодарности и финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-45-00018).

© Ватлин А.А., Фролова С.Г., Беккер О.Б., Даниленко В.Н., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Вклад авторов. А.А. Ватлин – написание статьи, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи; С.Г. Фролова – получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, отбор проб; О.Б. Беккер – анализ и интерпретация данных; В.Н. Даниленко – окончательное утверждение присланной в редакцию рукописи.


История статьи: поступила в редакцию 19.06.2023; доработана после рецензирования 12.11.2023; принята к публикации 15.11.2023

Для цитирования: Ватлин А.А., Фролова С.Г., Беккер О.Б., Даниленко В.Н. Изучение механизма действия новых производных хиноксалин 1,4-диоксида на модельном объекте *Mycobacterium smegmatis* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2024. Т. 32. № 1. С. 41–50. <http://doi.org/10.22363/2313-2310-2024-32-1-41-50>

Studying the mechanism of action of new derivatives of quinoxalin-1,4-dioxide on the model organism *Mycobacterium smegmatis*

Aleksey A. Vatlin^{1,2}  , Svetlana G. Frolova¹, Olga B. Bekker¹, Valeriy N. Danilenko¹

¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²RUDN University, Moscow, Russian Federation
vatlin_alexey123@mail.ru

Abstract. According to the World Health Organization (WHO), antibiotic resistance is currently one of the most serious threats to human health, food security, and development. Tuberculosis (TB) remains one of the deadliest bacterial diseases. The primary challenge in treating tuberculosis infection is the emergence of strains with multidrug resistance (MDR) to 4–9 drugs. The emergence of bacterial strains with MDR is a consequence of patients' insufficient adherence to treatment, interrupted therapy, improperly prescribed courses of chemotherapy, and, according to recent data, the accumulation of antibiotics in the environment, which can activate the natural drug resistance system in bacteria. The consequences of MDR to antibiotics include prolonged hospitalizations, increased medical expenses, and mortality. Therefore, the task is to develop new effective antibacterial agents with novel mechanisms to reduce the emergence of bacterial resistance. In this study, we investigated the mechanisms of action of new promising antimycobacterial derivatives of quinoxalin-1,4-dioxide on the model organism *Mycobacterium smegmatis*.

Keywords: antibiotics, bacterial resistance, mycobacteria, tuberculosis

Acknowledgements and Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 21-45-00018).

Authors' contributions. А.А. Ватлин – writing the article, obtaining, analyzing, and interpreting data, writing the article; С.Г. Фролова – obtaining, analyzing, and interpreting data, writing the article, sample selection; О.Б. Беккер – analysis and interpretation of data; В.Н. Даниленко – final approval of the manuscript submitted to the editorial office.

Article history: received 19.06.2023; revised 12.11.2023; accepted 15.11.2023.

For citation: Vatlin AA, Frolova SG, Bekker OB, Danilenko VN. Studying the mechanism of action of new derivatives of quinoxalin-1,4-dioxide on the model organism *Mycobacterium smegmatis*. *RUDN Journal of Ecology and Life Safety*. 2024;32(1):41–50. <http://doi.org/10.22363/2313-2310-2024-32-1-41-50>

Введение

Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) по-прежнему остается одной из основных угроз современной медицины – с 2018 по 2021 г. произошло 649 000 новых случаев туберкулеза с устойчивостью к рифампицину (RR-TB) – самому эффективному препарату первой линии, из которых в 78 % случаев возникла МЛУ (устойчивость к рифампицину и изониазиду) [1]. Возникновение штаммов с МЛУ может в том числе являться следствием недостаточной приверженности курсу лечения пациентов, прерванной терапии или неправильно подобранного курса химиотерапии. Россия, наряду с Индией и Китаем, входит в число стран с наибольшим распространением МЛУ-туберкулеза (WHO Global Tuberculosis Report 2022). Наибольшую опасность среди штаммов с МЛУ представляют штаммы ТБ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), устойчивые к 4–9 препаратам [2]. Увеличение уровня устойчивости также связывают с накоплением антибиотиков в природе и активацией систем природной лекарственной устойчивости у бактерий. По последним данным, одним из факторов, ускоряющим возникновение ЛУ, является наличие в окружающей среде минимальных селективных концентраций (minimal selective concentrations, MSC) антибиотиков, которые могут приводить к увеличению устойчивых штаммов в популяции и активации механизмов защиты клетки от антибиотиков (выброс или инактивация антибиотиков) [3–5]. Таким образом, одной из основных сегодняшних задач является поиск новых противотуберкулезных препаратов (ПТП), которые будут обладать принципиально новыми механизмами действия, что позволит преодолеть феномен лекарственной устойчивости.

Целью данного исследования являлось изучение механизма действия перспективных кандидатов в ПТП – нового производного хиноксалин 1,4-диоксида, синтезированного нами ранее **4** [6]. Данные соединения были отобраны благодаря высокой активности в отношении микобактерий – показано, что соединения данного класса вносят одно- и двухнитевые разрывы в ДНК, приводя к гибели клеток, что делает их перспективными для дальнейшего изучения и модификации [7]. Методами обратной генетики мы показали, что мутации в генах *MSMEG_4646*, *MSMEG_5122* и *MSMEG_1380* обеспечивают устойчивость к соединению **4** [6]. В данной работе с использованием генетических конструкций с повышенным уровнем экспрессии генов мы изучили механизмы перекрестной устойчивости к производным хиноксалин 1,4-диоксида на модельном объекте *Mycobacterium smegmatis*.

Материалы и методы

Штаммы бактерий и условия инкубации

Клетки штаммов *Mycolicibacterium (Mycobacterium) smegmatis* (табл. 1). выращивали в жидкой среде Middlebrook 7H9 (HiMedia) с добавлением OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза, каталаза), 0,05 % Tween 80, 0,4 % глицерина и в жидкой среде Lemco-Tween. Состав среды Lemco-Tween (на 1 литр): 5 г пептона (Oxoid), 5 г Lab Lemco (Oxoid), 5 г NaCl, 0,05 % Tween 80. Для выращивания *M. smegmatis* на агаризованной среде использовалась среда M290 (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd). *M. smegmatis* инкубировали при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Таблица 1. Бактериальные штаммы, использованные в этой работе

Бактериальные штаммы		
Название	Описание	Ссылка
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Штамм дикого типа (<i>w.t.</i>)	[8]
<i>M. smegmatis qdr</i>	Спонтанные мутанты <i>M. smegmatis</i> qdR1, qdR4 и qdR5, устойчивые к соединению 1	[9]
<i>M. smegmatis</i>	Штаммы <i>M. smegmatis</i> , несущие pMind, содержащую мутантные гены: pM4646w, pM4646q314, pM4648w, pM4648q1, pM5122	Настоящая работа

Источник: составлено авторами.

Клонирование генов, содержащих мутации в генах MSMEG_4646, MSMEG_4648, MSMEG_5122 в плазмидный вектор pMind

Гены MSMEG_4646, MSMEG_4648, MSMEG_5122 *M. smegmatis* были амплифицированы с геномной ДНК мутантных штаммов, устойчивых к производному хиноксалин 1,4-диоксида – **4**, и штамма WT *M. smegmatis* mc² 155 по праймерам, подобранным с помощью primer BLAST NCBI (табл. 2). Оптимальная температура отжига праймеров была подобрана с помощью градиентной ПЦР на приборе Bio-Rad T100 (США). Для амплификации использовали набор Tersus Plus PCR kit (Евроген). Амплифицированный фрагмент был клонирован в челночный репликативный вектор pMind по сайтам рестрикции *NdeI* и *SpeI* (Fast digest, Thermo Scientific, США). Для лигирования использовали T4-ДНК лигазу (Thermo Scientific, США). Полученными конструкциями трансформировали компетентные клетки *E. coli* по стандартной методике [10]. Оценка наличия целевой вставки нужной длины проводилась методом ПЦР-скрининга колоний. Из клеток *E. coli* конструкции со вставками целевых генов выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия). Полученные конструкции были трансформированы в компетентные клетки *M. smegmatis* mc² 155 методом электропорации по методике [11].

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Праймеры для клонирования в pMind
pM_4646_f	NdeI 5' ttttCATATGggaggaaatgttATGGGTGACAACGGCAACGG 3'
pM_4646_r	SpeI 5' ttttACTAGTTCATGCGTTCGCTCCCACAG 3'
pM_4648_f	NdeI 5' ttttCATATGggaggaaatgttATGGCGCACCGGTACAAGG 3'
pM_4648_r	SpeI 5' ttttACTAGTTCACATCGGCAGGTTGTAGGG 3'
pM_5122_f	NdeI 5' ttttCATATGggaggaaatgttATGACGTACGTCATTGCCGAAC 3'
pM_5122_r	SpeI 5' ttttACTAGTTCAGTCTCACCTGAGGC 3'

Источник: составлено авторами.

Тест на чувствительность *M. smegmatis* к производным хиноксалин 1,4-диоксида

Культуры инкубировали при 200 об./мин и 37 °С в течение ночи до OD 600 = 1,2. Затем определяли чувствительность к производным хиноксалин 1,4-диоксида методом бумажных дисков (диффузно-дисковым методом): культуру *M. smegmatis* разводили 1 : 9 : 10 (культура : вода : среда M290 (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd)) и высевали поверх основного слоя агар на чашки Петри. Чашки Петри инкубировали в течение 2 дней при 37 °С до полного роста бактериального газона. Ореолы ингибирования роста измеряли с точностью до 1 мм. Опыты проводили трехкратно; рассчитывали средний диаметр и стандартное отклонение (СО). Критерием отбора положительных результатов было наличие достоверной разницы в величине диаметра зоны ингибирования роста и отсутствие пересечения стандартных отклонений диаметров зон ингибирования роста экспериментального и контрольного образцов *M. smegmatis* [12].

Результаты

Исследование перекрестной устойчивости мутантов *M. smegmatis* qdR.

Для исследования перекрестной устойчивости к производным хиноксалин 1,4-диоксида нами были использованы спонтанные мутанты *M. smegmatis* mc2 155, устойчивые к 4-кратному МИК соединения 4 (табл. 3), полученные и частично охарактеризованные ранее [6]. С помощью сравнительного геномного анализа были выявлены мутации в четырех различных генах: *MSMEG_1380*, *MSMEG_4646*, *MSMEG_4648*, а также в гене и его промоторной области *MSMEG_5122*. Методами обратной генетики было показано, что мутации в генах *MSMEG_1380*, *MSMEG_4648* и *MSMEG_5122* приводят к устойчивости к описанным ранее производным хиноксалина 1,4-диоксида [6].

Для исследования перекрестной устойчивости к производным хиноксалин 1,4-диоксида, а следовательно, понимания наличия общности механизма действия или устойчивости *M. smegmatis* к различным хиноксалин

1,4-диоксидам были использованы спонтанные мутанты *M. smegmatis*, устойчивые к соединению 4: *M. smegmatis* qdR1, *M. smegmatis* qdR4 и *M. smegmatis* qdR5 (см. табл. 2). Возможную перекрестную устойчивость проверяли к следующим соединениям: 4, 13с, 12с, 13а, 16с, 14а, 15с (соединения, представлены в табл. 3).

Таблица 3. Химические соединения, использованные в исследовании

№	Название	Ссылка
4	2-карбоэтокси-3-метил-6-(пиперазин-1-ил)-7-хлорхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	[6]
13с	2-ацетил-7-(пиперазин-1-ил)-3-трифторметил-6-хлорхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	[9]
12с	7-(пиперазин-1-ил)-3-трифторметил-6-хлор-2-этоксикарбонилхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	
13а	2-ацетил-7-(пиперазин-1-ил)-3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	
16с	7-(пиперазин-1-ил)-3-трифторметил-2-фураноил-6-хлорхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	
14а	7-(пиперазин-1-ил)-2-пропаноил-3-трифторметилхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	
15с	2-бензоил-7-(пиперазин-1-ил)-3-трифторметил-6-хлорхиноксалин 1,4-диоксида гидрохлорид	

Источник: составлено авторами.

Исследование выявило перекрестную устойчивость ко всем испытанным соединениям практически во всех случаях. Мутанты серии qdR были устойчивы к большинству проанализированных производных хиноксалин 1,4-диоксидов (рис. 1). Штамм *M. smegmatis* qdR1 в целом был чувствительнее остальных мутантов, хотя и достоверно устойчивее штамма дикого типа ко всем соединениям.

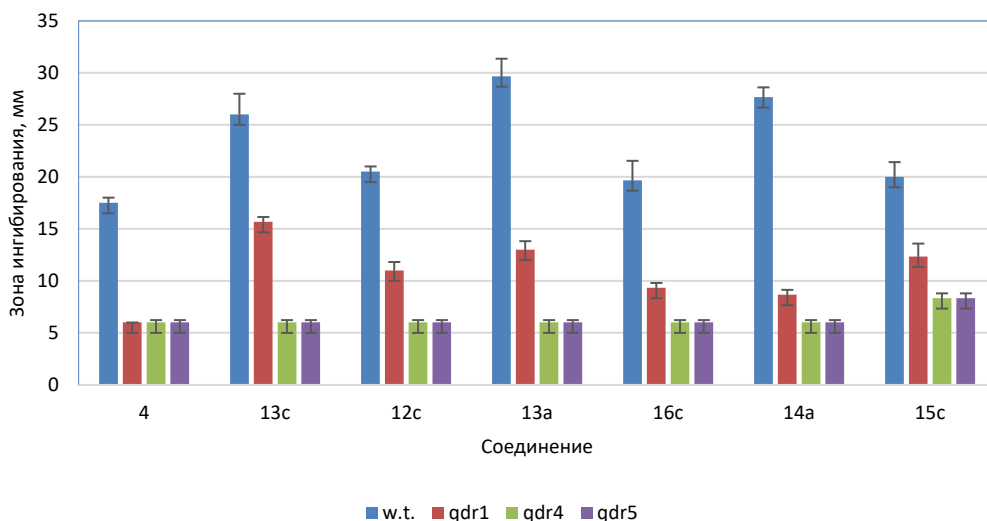


Рис. 1. Диаметры зон ингибирования роста вокруг дисков, содержащих различные хиноксалин 1,4-диоксиды, в отношении спонтанных мутантов *M. smegmatis*, устойчивых к соединению 4. Концентрация соединений – 10 нмоль/диск.

Планки погрешностей отражают стандартное отклонение

Источник: составлено авторами.

Исследование роли отдельных генов и мутаций в формировании устойчивости к хиноксалин 1,4-диоксидам

Ранее проведенное полногеномное секвенирование показало, что мутанты *M. smegmatis*, *qdr1*, *M. smegmatis*, *qdr4* и *M. smegmatis*, *qdr5* имеют уникальные несинонимичные мутации [6], что подтверждает предыдущие сообщения о ДНК-повреждающих свойствах хиноксалин 1,4-диоксидов [7].

Количество уникальных мутаций в каждом штамме коррелировало с уровнем устойчивости, что позволяет предположить, что их комбинация имеет синергический эффект. Мы проанализировали возможную связь всех мутантных генов и выделили несколько генов, связанных с окислением пирувата до ацетил-КоА.

Таблица 4. Уникальные мутации в геномах мутантов *M. smegmatis qdr1*, *M. smegmatis qdr4* и *M. smegmatis qdr5*

Protein ID	Locus tag	Annotation	Codon	SNP	A.a.	Distance to gene
<i>M. smegmatis qdr1</i>						
YP_888911.1	MSMEG_4648	DNA-binding protein	49	CAG > CCG	Q > P	–
YP_889369.1	MSMEG_5122	Ferredoxin	–	–	–	71–72
<i>M. smegmatis qdr4</i>						
YP_888909.1	MSMEG_4646	Pyruvate synthase	95	AAC > CAC	N > H	–
<i>M. smegmatis qdr5</i>						
YP_888909.1	MSMEG_4646	Pyruvate synthase	274	CCG > CTG	P > L	–

Источник: составлено авторами.

Сверхэкспрессия целевых генов дикого типа и их мутантных вариантов у *M. smegmatis*

Для исследования роли отдельных генов и мутаций в них в формировании устойчивости к хиноксалин 1,4-диоксидам нами использован подход – сверхэкспрессия целевых генов дикого типа и их мутантных вариантов (табл. 4). Для этого подхода нами использован вектор pMIND [13], имеющий ориджины для репликации в клетках *E. coli* и микобактерий, а также индуцибельный тетрациклиновый промотор.

Нами были получены следующие конструкции:

- pM4646wt: pMIND, содержащая ген *MSMEG_4646* дикого типа;
- pM4646qdr4: pMIND, содержащая ген *MSMEG_4646* с мутацией AAC > CAC в кодоне 95 (N → H), соответствующая мутанту *M. smegmatis qdr4*;
- pM4646qdr5: pMIND, содержащая ген *MSMEG_4646* с мутацией CCG > CTG в кодоне 274 (P → L), соответствующая мутанту *M. smegmatis qdr5*;
- pM4648wt: pMIND, содержащая ген *MSMEG_4648* дикого типа;
- pM4648qdr1: pMIND, содержащая ген *MSMEG_4648* с мутацией CAG > CCG в кодоне 274 (Q → P), соответствующая мутанту *M. smegmatis qdr1*;

- pM5122: pMIND, содержащая ген MSMEG_5122 дикого типа.

Данными конструкциями был трансформирован штамм *M. smegmatis* mc2 155. Фенотип лекарственной чувствительности полученных трансформантов *M. smegmatis*, несущих сконструированные плазмиды, оценивался диско-диффузным методом, в качестве соединения-контроля использовался рифампицин (rif) (рис. 2).

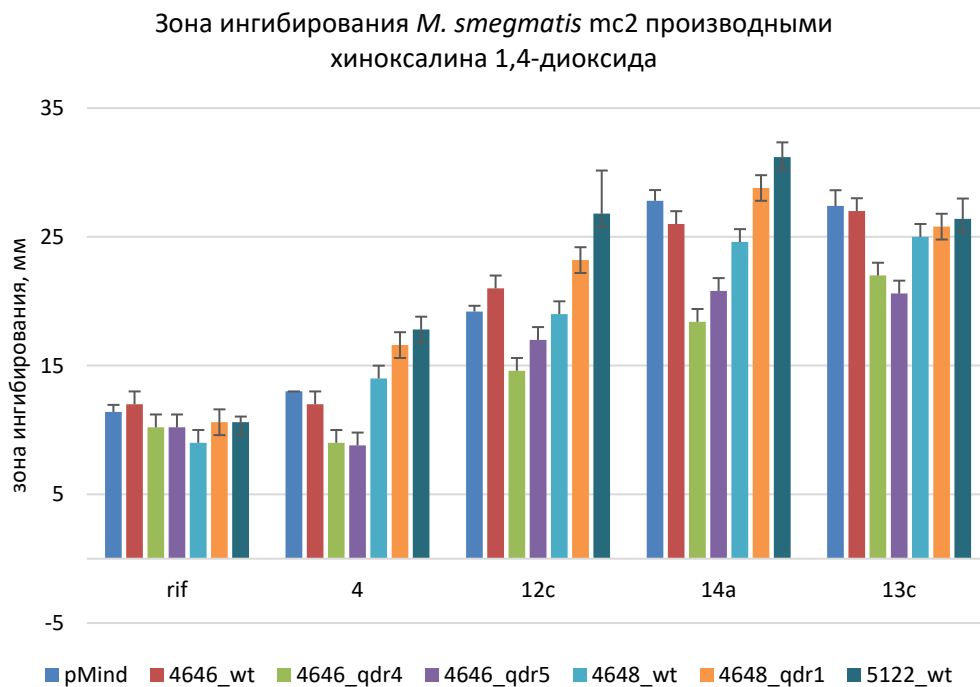


Рис. 2. Диаметры зон ингибирования роста вокруг дисков, содержащих различные хиноксалины 1,4-диоксида, на культурах *M. smegmatis*. Концентрация соединений – 10 нмоль/диск. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение

Источник: составлено авторами.

Результаты (рис. 2) показали достоверное повышение устойчивости к соединениям 4, 12с, 14а и 13с при сверхэкспрессии мутантных генов MSMEG_4646. Сверхэкспрессия мутантных генов MSMEG_4648 не приводила к повышению устойчивости. Сверхэкспрессия гена дикого типа MSMEG_5122 закономерно приводила к повышению чувствительности к соединениям 4 и 12с, вероятно, смещая равновесие окислительно-восстановительной реакции за счет присутствия большего количества донора электронов.

Выводы

В результате проведенной работы нам удалось установить предполагаемый механизм действия производных хиноксалина 1,4-диоксида на модельном объекте *Mycobacterium smegmatis*. Можно предположить, что различия в

уровне чувствительности мутантных штаммов основаны на различных наборах мутаций у разных штаммов. Так, у мутантов, qdR4 и qdR5 есть мутации в гене *MSMEG_4646* (см. табл. 4), кодирующем альфа-субъединицу ферредоксин-оксидоредуктазы (пируват-синтазы), участвующей в метаболизме пирувата. У мутанта qdR1 обнаружена мутация в гене *MSMEG_4648*, аннотированным как ДНК-связывающий белок, который может выступать регулятором транскрипции находящегося рядом оперона, кодирующего альфа- и бета-субъединицы вышеуказанной пируват-синтазы и *MSMEG_5122*. У одного из исследуемых ранее мутантов мы смогли обнаружить мутацию только в гене *MSMEG_5122*, кодирующем непосредственно ферредоксин, а мутант qdR1 также имеет две мутации в предположительной промоторной области гена *MSMEG_5122* (позиции – 71–72), при этом оба мутантных штамма были устойчивы к исследуемому соединению. Ферредоксин выступает акцептором электронов для пируват-синтазы в процессе окисления пирувата до ацетил-КоА. Вероятно, мутантная субъединица конкурирует с таковой дикого типа при формировании комплекса пируват-синтазы, что в сумме снижает эффективность его работы и активации хиноксалин 1,4-диоксидов, приводя к снижению чувствительности штамма к исследуемому соединению.

Список литературы

- [1] Salari N, Kanjoori AH, Hosseinian-Far A, Hasheminezhad R, Mansouri K, Mohammadi M. Global prevalence of drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty*. 2023 May 25;12(1):57. <http://doi.org/10.1186/s40249-023-01107-x>
- [2] Tiberi S, Utjesanovic N, Galvin J, Centis R, D'Ambrosio L, van den Boom M, et al. Drug resistant TB – latest developments in epidemiology, diagnostics and management. *Int Journal Infection Diseases*. 2022 Nov;124 Suppl 1:S20–25.
- [3] Prieto Martin Gil S, Tajuelo A, López-Siles M, McConnell MJ. Subinhibitory Concentrations of Clinically-Relevant Antimicrobials Affect Resistance-Nodulation-Division Family Promoter Activity in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12.
- [4] Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*. 2011 Jul;7(7):e1002158.
- [5] Stanton IC, Murray AK, Zhang L, Snape J, Gaze WH. Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration. *Communication Biology*. 2020 Sep 3;3(1):1–11.
- [6] Frolova SG, Vatlin AA, Maslov DA, Yusuf B, Buravchenko GI, Bekker OB, et al. Novel Derivatives of Quinoxaline-2-carboxylic Acid 1,4-Dioxides as Antimycobacterial Agents: Mechanistic Studies and Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals*. 2023 Nov;16(11):1565.
- [7] Junnotula V, Sarkar U, Sinha S, Gates KS. Initiation of DNA strand cleavage by 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide antitumor agents: mechanistic insight from studies of 3-methyl-1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide. *Journal American Chemical Society*. 2009 Jan 28;131(3):1015–1024.
- [8] Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jr WRJ. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*. 1990;4(11):1911–1919.

- [9] Buravchenko GI, Maslov DA, Alam MS, Grammatikova NE, Frolova SG, Vatlin AA, et al. Synthesis and Characterization of Novel 2-Acyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-Dioxides as Potential Antimicrobial Agents. *Pharmaceuticals*. 2022 Feb;15(2):155.
- [10] Lázaro-Silva DN, Mattos JCPD, Castro HC, Alves GG, Amorim LMF. The Use of DNA Extraction for Molecular Biology and Biotechnology Training: A Practical and Alternative Approach. *Creative Education*. 2015 May 19;6(8):762–772.
- [11] Parish T, Brown AC (eds.). *Mycobacteria Protocols: Second Edition*. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. Vol. 465.
- [12] Erkmen O. (ed.) *Practice 18 – Antibiotic sensitivity test technique*. In: O Erkmen Academic Press; Laboratory Practices in Microbiology, 2021. p. 181–186.
- [13] Blokpoel MCJ, Murphy HN, O’Toole R, Wiles S, Runn ESC, Stewart GR, et al. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Researches*. 2005 Feb 1;33(2):e22.

Сведения об авторах:

Ватлин Алексей Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Российская Федерация, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3. ORCID: 0000-0002-6673-7633. E-mail: vatlin_alexey123@mail.ru

Фролова Светлана Григорьевна, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Российская Федерация, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3. E-mail: sveta.frolova.1997@bk.ru

Беккер Ольга Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Российская Федерация, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3. E-mail: obbekker@mail.ru

Даниленко Валерий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Российская Федерация, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3. E-mail: valerid@vigg.ru