

БЕЛКИ RPF – ФАКТОРЫ РЕАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ АКТИНОБАКТЕРИЙ

©2016 г. В. Д. НИКИТУШКИН, Г. Р. ДЕМИНА,
А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ

*Институт биохимии им. А.Н.Баха,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Структура белков Rpf. III. Ферментативные свойства белков Rpf. IV. Функциональные свойства белков Rpf. V. Механизм действия. VI. Перспективы применения белков Rpf в медицине. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Бактериями заселены практически все экологические ниши на планете, при этом их уникальная способность переживать неблагоприятные условия среды является важным фактором их выживаемости, распространения и патогенности. Вместе с тем, при наступлении неблагоприятных условий, бактерии способны переходить в особое физиологическое состояние – состояние покоя, характеризующееся низкой метаболической активностью, морфологическими изменениями формы, утолщением клеточной стенки, а также отсутствием роста на типичных питательных средах и неспособностью формировать колонии. Поскольку клетки в данном состоянии проявляют низкую метаболическую активность, то такие

Принятые сокращения: МТБ – *Mycobacterium tuberculosis*; НК – «некультивируемость», Rpf – фактор реактивации покоящихся форм актинобактерий (англ. – Resuscitation promoting factor); RipA – А белок взаимодействия с Rpf (англ. Resuscitation promoting factor interacting protein A); ПГ – пептидогликан; ФПГ – фрагменты пептидогликана; GlcNAc – N-ацетилглюкозамин; MurNAc – N-ацетилмурамовая кислота; DAP-диаминопимелиновая кислота; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (англ. Matrix assisted laser desorption/ionization).

Адрес для корреспонденции: vadimchemist@gmail.com

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 16-15-00245): разделы IV–VI и программой президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»: разделы I– III.

покоящиеся формы бактерий, проявляющие устойчивость к антибиотикам, являются источником хронической инфекции в организме хозяина, которая с трудом поддается лечению. В частности, согласно распространенной точке зрения, латентная форма туберкулеза связана именно со способностью бактерии-возбудителя *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) переходить в состояние покоя, сходное со спорообразованием. Предполагается, что покоящиеся формы МТБ могут реактивироваться в тканях хозяина, с образованием активно делящихся клеток.

Покоящееся состояние у неспорулирующих бактерий часто сопровождается появлением «некультивируемости» («НК») – временной неспособности бактериальных клеток образовывать колонии на плотной питательной среде. При этом такие клетки сохраняли пролиферативный потенциал (способность к росту как в жидких, так и на плотных средах), который проявлялся после проведения процедуры реактивации в жидкой среде [1]. При изучении клеток грамположительной бактерии *Micrococcus luteus*, принадлежащей к одному с микобактериями порядку *Actinomycetales*, было обнаружено, что клетки, выращенные на бедной питательной среде переходили в состояние покоя, при этом 99,99 % клеток теряли способность к росту на плотных питательных средах [2–4]. Однако клетки можно было «оживить» (восстановить их способность к делению), добавив в культуру стерильный, отфильтрованный супернатант, полученный из культуры растущих клеток *M. luteus* [5, 6]. В ходе последующих исследований было обнаружено, что клетки *M. luteus* секретируют в среду культивирования белок, который был способен инициировать реактивацию покоящихся клеток, а также стимулировать в определенных условиях размножение обычных клеток. Также было обнаружено, что этот белок способен стимулировать рост и некоторых других G+C богатых грамположительных бактерий: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium smegmatis* и *M. tuberculosis* [6]. Белок проявлял свою активность в пиколярных концентрациях и был назван *Resuscitation promoting factor (Rpf)* – фактор реактивации покоящихся форм микроорганизмов [7, 8].

Rpf, секретируемый клетками *M. luteus*, представляет собой термолабильный, чувствительный к обработке трипсином белок, с молекулярной массой ~ 19 кДа [7]. Изначально из-за активности в низких пиколярных концентрациях Rpf был назван бактериальным цитокином [6], однако сравнительно высокая концентрация Rpf в культуральной среде *M. luteus* и отсутствие гипотетических рецепторов к нему на поверхности клетки не подтвердили первоначальную

гипотезу. После полногеномного секвенирования было установлено, что геном *M. luteus* содержит одну копию этого белка [8]. С появлением все большего количества секвенированных геномов различных бактерий стало ясно, что Rpf *M. luteus* является одним из представителей широкого семейства бактериальных секретлируемых белков (Rpf-подобные белки) для целого ряда грамположительных Г–Ц богатых бактерий, принадлежащих филуму *Actinobacteria*. В этот тип входят представители около 20 семейств из шести порядков (*Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Corynebacteriales*, *Micrococcales*, *Pseudonocardiales*, *Propionobacteriales*), в том числе представители родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*. При этом количество ортологов генов *rpf* для каждого вида варьирует от 1 до 5. Все эти белки объединяет наличие схожего по аминокислотной последовательности консервативного домена (около 75 aa). На рис. 1. для иллюстрации представлены сравнения аминокислотных последовательностей каталитических доменов белков Rpf *M. luteus* и микобактерий *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*.

На рис. 2 представлена кладограмма, построенная на основании сходства (> 60 %) консервативного домена Rpf у различных видов актинобактерий, иллюстрирующая широкое распространение белков Rpf среди бактерий разных порядков. Имеются также данные о том, что белки, подобные Rpf, найдены у фирмикут (*Firmicutes*) [9] и грамотрицательной бактерии *Salmonella typhimurium*, хотя отличие в аминокислотных последовательностях у данных представителей от Rpf белков актинобактерий существенно [10]. Широкое распространение белков Rpf и их важная роль в физиологии бактерий привели к интенсивным исследованиям этого семейства белков. Цель данной работы – познакомить читателя с современными взглядами на структуру, биологические функции и применение белков данного семейства.

II. СТРУКТУРА БЕЛКОВ RPF

При изучении структуры белка было выявлено, что Rpf из *M. luteus* состоит из консервативного домена, расположенного на N-конце молекулы и LysM домена (входящего также в состав ферментов, вовлеченных в метаболизм клеточной стенки), расположенного на C-конце [7]. Было установлено, что LysM домен участвует во взаимодействии ферментов с компонентами пептидогликана [11]. В дальнейшем была подтверждена доменная организация белков Rpf и для представителей рода *Mycobacterium* (рис. 3). В отличие от Rpf *M. luteus* микобактериальные Rpf – белки не имеют в своем составе домен LysM, однако имеют консервативный домен и ряд доменов, в

| | | | |
|------------------------------|-----|--|-----|
| Rpf M. luteus | 41 | AAATVDTDRLAECESNGTWDINTGNFGYGGVQFTLSSWQAVGGEG--- | 97 |
| Rv1009 RpfB M. tuberculosis | 279 | VIDGSIWDAIAGCEAGGVAINTNGNGYGGVQDQGTWEANGGLRYAPRADL | 338 |
| Rv0867c RpfA M. tuberculosis | 38 | AATDGEWDVARCHESGGNWSINTNGYLGGLQFTQSTWAAHGGEFAPSAQLASREO | 97 |
| Rv1884c RpfC M. tuberculosis | 67 | AGSPNWDVAQCESGGNWAANTGNKYGGLQFKPATWAAFVGGV---NPAAASREO | 123 |
| Rv2389c RpfD M. tuberculosis | 48 | KADDIDWDAIACESSGGVAANTGNGLYGGLOISQATWDSNGGV---SPAAASPOO | 104 |
| Rv2450c RpfE M. tuberculosis | 95 | VAYSNWDVAIQCESGGNWSINTNGNGYGGVQFTAGTWRANGSG---SAANASREO | 151 |
| MSMEG_5439 RpfB M. smegmatis | 292 | VSNHTWDVAIQCESGGNVAINTNGNGYGGVQDQNTWERNGLRYAPRADL | 351 |
| MSMEG_5700 RpfA M. smegmatis | 40 | AATDGEWDVARCHESGGVAINTNGNGYGGLOFSPSTWRAHGTEFAAAYM | 99 |
| MSMEG_4643 RpfE M. smegmatis | 30 | NADSVNWDVAIACESSGGNWSINTNGNGYGGLOFLNLTWRSHGGAG--- | 86 |
| MSMEG_4640 Rpf M. smegmatis | 27 | AADSVNWDVAIACESSGGNWSINTNGNGYGGLOFKQSTWAAHGGV---SPATASREO | 83 |
| | | ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| Rpf M. luteus | 98 | RAELIQLDLOGGAWPLCSOKLGLTQADADAGDVDATEAAPVAVERTATVORQSAAD | 157 |
| Rv1009 RpfB M. tuberculosis | 339 | VAEVTRLRQGWAWPVCARAGAR--- | 362 |
| Rv0867c RpfA M. tuberculosis | 98 | VGERVLTQGRGAWPVCGRGLSNATPREVLPASAAMD-APLDAAVNGEPAPL-APP-PA | 154 |
| Rv1884c RpfC M. tuberculosis | 124 | VANRVLAEOGLDAPWTCGAASGLPIALWSKPAQGIKQ--IINELIWAQTQAST-P--- | 175 |
| Rv2389c RpfD M. tuberculosis | 105 | VADNIMKTQPGAWPKCSSCSQGDAPLGS-----LTHLLT-----FL-AA--- | 143 |
| Rv2450c RpfE M. tuberculosis | 152 | VAENVLRSQGIRAWPVCGRRG----- | 172 |
| MSMEG_5439 RpfB M. smegmatis | 352 | IATVTQSRQGWAWPVCGRIGAR----- | 375 |
| MSMEG_5700 RpfA M. smegmatis | 100 | VAERVLASQKAWPVCGRGLSGATPRNVVAEPEP---APLDPGVNGELPPFA---P- | 151 |
| MSMEG_4643 RpfE M. smegmatis | 87 | VAENVLRTQGIRAWPVCGRRG----- | 107 |
| MSMEG_4640 Rpf M. smegmatis | 84 | VAENVLRTQGLAAWPKCGARGGVPAV-WGGGAGAPAA-GSGCSAVRPGAVLGI-LD--- | 136 |
| | | ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |

Рис. 1. Сравнение каталитических доменов белков Rpf актинобактерий: *Mycosoccus luteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*.

Биоинформатический анализ проводился на портале UniProt www.uniprot.org.

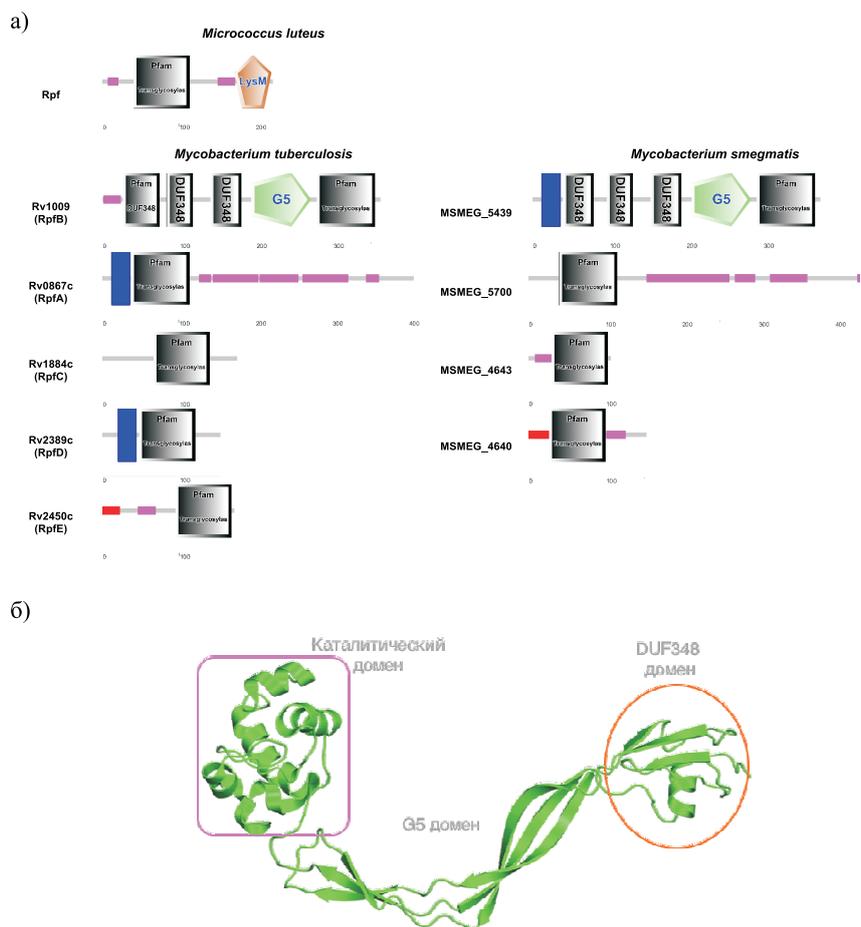


Рис. 3. Доменная организация Rpf-продуктов микобактерий *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*.

а). Схематическое сравнение доменов белков семейства Rpf у *M. luteus* и микобактерий (синим показаны домены связывания Rpf с цитоплазматической мембраной; красным – сигнальные последовательности; фиолетовым – Pro/Ala богатые регионы);

б). Пространственное расположение доменов в молекуле RpfB (PDB 3EO5).

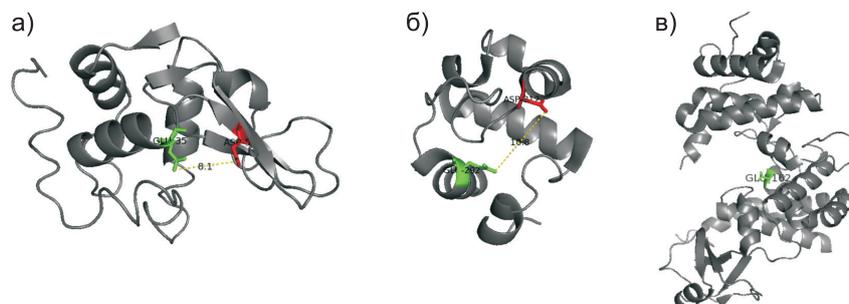


Рис. 4. Структура лизоцима (PDB 1LZE), Rpf (PDB 3EO5), литической трансгликозилазы Slt35 – *E. coli* (PDB 1D0K). Обращает на себя внимание сходство в организации активного центра указанных ферментов. В частности, взаимное расположение остатков Asp и Glu. Остаток Glu является консенсусным для всех трех случаев.

и ряда литических ферментов, участвующих в метаболизме клеточной стенки бактерий [14, 15]. В соответствии с данными, полученными при изучении кристаллических структур, было установлено, что в частности RpfB может рассматриваться как «мини-лизоцим» [16]. Подобно лизоциму, каталитический центр белка состоит из шести сайтов (A–F) связывания с пептидогликаном [16]. Но с другой стороны, RpfB также проявляет гомологию и по отношению к ряду литических трансгликозилаз *E. coli* (Slt35, Slt70) [13], что наглядно продемонстрировано на рис. 4. Таким образом, структурные исследования позволяют предположить, что консервативный домен белков Rpf представляет собой гибрид хорошо известного фермента лизоцима животного происхождения и бактериальных литических трансгликозилаз. В свою очередь, эта структура предполагает наличие ферментативных свойств у белков Rpf.

По сравнению с достаточно просто устроенным белком Rpf *M. luteus*, белок RpfB (362 а.к) из *M. tuberculosis* демонстрирует наиболее сложную структурную организацию: помимо каталитического домена, состоящего из 75 аминокислот, дополнительно выделяют G5 домен и три DUF348 домена (Domains of Unknown Function, домены неизвестной функции) [18–20]. Как показали исследования, G5 домен (название которого происходит вследствие наличия пяти консервативных остатков глицина в его структуре) является важным компонентом многих белков, вовлеченных в процесс деградации клеточной стенки и формирования биопленок, и имеет функциональную роль близкую к LysM домену Rpf *M. luteus* [18]. Детальные исследования кристаллической структуры белка

Δ_{DUF} RpfB+G5 позволили установить точную топологию и взаимное расположение β -тяжей G5, соответствующих структуре β -ТН- β мотива [16]. Но, пожалуй, самым интересным оказалось наблюдение, что этот домен обладает адгезивными свойствами по отношению к микобактериальному пептидогликану, и его изогнутая форма способствует стерически выгодной локализации белка Rpf в ячейках ПГ [16].

До последнего времени структура и функции трех DUF348 доменов в структуре RpfB оставалась неисследованной. Однако совсем недавно было показано, что этот домен состоит из одной α -спирали упакованной с четырьмя нитями β -тяжей [19], при этом изучение пространственной организации этого домена выявило неожиданное сходство с эукариотическим белком убиквитином [19]. Значение DUF-доменов в белках Rpf по-прежнему остается неясным. Необходимо подчеркнуть, что основной особенностью убиквитина в клетках эукариот является способность взаимодействовать с большим количеством макромолекул [19]. Возможно наличие убиквитин-подобного домена в молекуле Rpf позволяет последнему взаимодействовать с другими белками, возможно с партнером белка Rpf – RipA (см ниже).

Таким образом, структурные исследования белков Rpf определенно свидетельствуют о принадлежности их к классу пептидогликангидролаз, что позволяет предположить наличие ферментативной активности, которая может быть важна для наблюдаемых физиологических эффектов белков Rpf.

III. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА RPF

Исходя из того, что белок Rpf представляет собой гидролитический фермент, который может расщеплять, подобно лизоциму и литическим трансгликозилазам, 1 \rightarrow 4 гликозидные связи между остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетил(гликолил) мурамовой кислоты бактериального пептидогликана [15, 23], следует возможность экспериментальной проверки этого предположения.

Наличие ферментативной активности белков Rpf было установлено в экспериментах с применением искусственного субстрата 4-метилумбеллиферил- β -D-N,N',N''-ацетилглюкозамина (MUF-3-NAG) – синтетического аналога компонента клеточной стенки, а также непосредственно на выделенном ПГ. В обоих случаях была показана способность рекомбинантного белка Rpf *M. luteus* гидролизовать пептидогликан [24, 25].

Для подтверждения ферментативной активности белков Rpf был проведен сайт-направленный мутагенез. Хорошо известно, что в

активном центре у лизоцимоподобных белков присутствует консервативный остаток глутаминовой кислоты, принимающий участие в катализе. У лизоцима такой глутамат находится в положении 35 (Glu³⁵), у литической трансгликозилазы Slт35 в 162 положении, у трансгликозилазы Slт70 в положении 478 [23]. У белков Rpf из *M. luteus*, как предполагается, каталитически-активный глутамат находится в положении 54 [13].

Экспериментально выявлено, что замена предполагаемого каталитического глутамата в белке Rpf *M. luteus* на глутамин (E54Q) приводила лишь к частичной потере активности (как это описано в случае лизоцима и литических трансгликозилаз) [15, 26, 27], в то же время замена на аланин (E54A) и лизин (E54K) существенно подавляла ферментативную активность [21]. Максимальное ингибирование активности проявлялось у мутантной формы Rpf с заменой двух цистеиновых остатков, которые могут принимать участие в образовании функционально значимой внутримолекулярной дисульфидной связи [13]. Действительно, замена Cys⁵³ и Cys¹¹⁴ по отдельности приводила лишь к частичному подавлению активности, в то же время замена обеих аминокислот приводила к практически полной инактивации Rpf [21]. Недавние исследования белка RpfC с применением метода ЯМР показали важность формирования дисульфидной связи между консервативными остатками цистеина в поддержании и модуляции конформации каталитического домена в процессе катализа [15]. Эти результаты подтвердили каталитическую активность белков Rpf и их сходство с мурамидазами.

IV. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ RPF

В первых исследованиях роли белков Rpf было продемонстрировано, что введение рекомбинантного белка Rpf *M. luteus* в пиколярных концентрациях стимулировало рост клеток *M. luteus* на бедной питательной среде [6]. Впоследствии был обнаружен подобный эффект по отношению к клеткам *M. smegmatis* [25]. В целом, в этих и других экспериментах было выявлено, что зависимость роста бактериальных клеток от экзогенно добавленного Rpf проявляется лишь в условиях, когда клетки подвергались тем или иным стрессовым воздействиям, в то же время, активные клетки, выращенные на соответствующих сбалансированных средах, не проявляли подобной чувствительности [7, 28]. В частности, выраженное действие рекомбинантных белков RpfA-D *M. tuberculosis* проявлялось в стимуляции роста бактерий при их низкой начальной концентрации в лаг-фазе. При этом наблюдалась

перекрестная активность белков Rpf, выделенных из МТВ, по отношению к клеткам *M. luteus* и *M. smegmatis* [26].

В ряде работ было продемонстрировано, что рекомбинантные белки Rpf эффективно стимулируют реактивацию НК, покоящихся клеток *M. tuberculosis*, *Rhodococcus rodochrous* [27] и *M. smegmatis* [28], полученных в моделях *in vitro*. Реактивационная способность белка Rpf *M. luteus* также была продемонстрирована *in vivo* по отношению к покоящимся микобактериям, выделенным из макрофагов, зараженных МТВ [29]. Экзогенное добавление рекомбинантного белка Rpf могло быть заменено гиперэкспрессией этого белка в штамме *M. smegmatis* (штамм pAGR), при этом такие модифицированные клетки проявляли способность к спонтанной реактивации из некультивируемого состояния без добавления экзогенного Rpf [28].

Было установлено, что максимальный синтез Rpf в клетках *M. luteus* происходит в конце логарифмической фазы роста и молекулы Rpf обнаруживаются не только в культуральной среде, но и на поверхности клеток продуцента [7, 9]. Белки Rpf в культуральной жидкости МТВ были также обнаружены, однако в значительно меньшем количестве, чем у *M. luteus* [26].

Важный вопрос для понимания биологической функции белков Rpf состоит в их необходимости для роста бактерий-продуцентов. Синтез Rpf является, очевидно, необходимым для деления клеток *M. luteus* поскольку мутантные клетки с инактивированным геном *rpf* оказались нежизнеспособными [7]. Антитела против Rpf подавляли рост бактерий *in vitro* [7], что подтверждает эссенциальность гена *rpf* для роста культуры. В отличие от *M. luteus* ноль мутанты по генам *rpf* у МТВ оказались жизнеспособными *in vitro* и *in vivo*. Мутация в одном из генов, кодирующих синтез белков Rpf у МТВ, не влияет на процесс реактивации, не останавливает рост клеток и не приводит к гибели бактерий, однако подобные мутации способны вызывать изменения в морфологии клеток [33, 34]. Делеция отдельных генов сопровождается незначительным повышением экспрессии оставшихся генов. Тот факт, что инактивация генов *rpf* по отдельности не влияет на реактивацию, показывает определенную степень взаимозаменяемости белков Rpf в процессе реактивации. Однако одновременная мутация в генах, кодирующих RpfA/C/D и RpfB/D/E, приводит к значительному снижению вирулентности бактериальных штаммов *M. tuberculosis* на моделях с мышами, а также к неспособности этих мутантов к реактивации из состояния покоя *in vivo* [32]. Таким образом, у *Mycobacterium tuberculosis* наблюдается «избыточность» в генах *rpf*, что, очевидно, обеспечивает эволюционную устойчивость патогена.

Был проведен анализ мутантных штаммов *M. tuberculosis* с одновременно четырьмя и полностью (пятью) делетированными (нокаутированными) генами *rpf*(A–E). Эти штаммы были изучены в различных условиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Четырехкратные мутанты оказались способными к росту *in vitro* как в жидких, так и на твердых средах, в то же время пятикратно нокаутированные клетки выявили задержку в образовании колоний роста на твердой среде [33]. Кроме того, было обнаружено, что исследуемые мутанты не способны к реактивации из покоящегося состояния, а введение генов *rpf* в такие клетки частично восстанавливало эту способность [35, 37]. Четырехкратные мутанты подавляли размножение в мышинной модели аэрогенного хронического туберкулеза, один из мутантов с делетированными генами *rpf* ACBE практически полностью терял способность развиваться *in vivo* и, соответственно, быть вирулентным для животных [33]. Отсутствие обоих генов *rpf* у *Corynebacterium glutamicum* не влияло на рост культуры, однако повторный рост после длительного хранения значительно ухудшался [34]. Интересно также отметить, что один из белков Rpf (Rpf2) *Corynebacterium glutamicum* гликозилирован (содержит маннозу и галактозу в молекуле белка). Однако о наличии гликозилированных форм среди микобактериальных белков Rpf не сообщалось.

Хотя белки Rpf не являются важными для активного роста МТБ, экспериментально доказано, что они определяют переход покоящихся форм МТБ в активное состояние как *in vitro* [33], так и *in vivo* [37, 39] на модели хронического туберкулеза у животных. Экспрессия всех пяти *rpf* генов МТБ H37Rv была изучена в течение разных стадий роста (от экспоненциальной фазы роста до покоящегося состояния и последующей Rpf-зависимой реактивации) с помощью ПЦР в реальном времени. Анализ генов *rpf* МТБ выявил, что все гены (*rpfA*, *rpfB*, *rpfC*, *rpfD*, *rpfE*) экспрессированы (с разной степенью) на ранней экспоненциальной фазе [31]. У экспоненциально растущих клеток сохраняется высокая экспрессия только *rpfB* [34, 40], однако относительно экспрессии остальных генов *rpf* данные разнятся [34, 40]. В стационарной фазе роста наблюдается общая тенденция к снижению всех генов *rpf* у МТБ, сходно с экспрессией *rpf* у *M. luteus*, за исключением гена *rpfC* [36].

Анализ изменения экспрессии генов *rpf* при реактивации НК клеток *M. smegmatis* обнаружил, что лишь гомолог RpfA (MSMEG_5700) проявлял повышенную экспрессию на поздних стадиях реактивации перед началом деления клеток [37].

Были проанализированы уровни экспрессии генов *rpf* в различных стрессовых условиях (голодание, гипоксия, снижение pH). При голодании (инкубация в течение 24 и 96 часов в фосфатном буфере pH 7,2) через 24 часа после начала инкубации экспрессия всех генов *rpf* была увеличена относительно контроля (клетки до начала стрессового воздействия), дальнейшая инкубация до 96 часов привела к значительному снижению экспрессии генов *rpfA*, *rpfB* и *rpfE*, при этом экспрессия генов *rpfC* и *rpfD* сохранялась на некотором уровне. В условиях гипоксии (снижение кислорода) увеличивалась экспрессия *rpfC* и *rpfE*. При снижении pH до 5,5–4,5 повышалась экспрессия *rpfD* и *rpfE*. Данные транскрипционного анализа показали, что белки, кодируемые генами *rpf* экспрессируются по-разному в зависимости от условий и фаз роста и, следовательно, могут регулироваться по отдельности. Так биосинтез RpfA регулируется цАМФ-зависимым транскрипционным рецепторным белком (CRP) Rv3676, регулирующим экспрессию генов, вовлеченных в персистенцию микобактерий туберкулеза и/или выход из состояния покоя [38], RpfC позитивно регулируется сигма фактором SigD [39], негативно регулируется двухкомпонентной регуляторной системой MprAB, которая оказывает действие на многие гены в SigD регулоне [43–45].

По-видимому, функционально ортологи Rpf у *M. tuberculosis* не отличаются, однако регуляция их экспрессии различна, что может указывать на «привязанность» различных белков Rpf к различным стрессовым факторам внешней среды.

V. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Согласно материалу, изложенному в разделе II и III следует, что белки Rpf обладают ферментативной активностью, что позволяет предположить, что гидролиз пептидогликана под действием Rpf является важным звеном в процессе стимуляции роста и реактивации покоящихся форм микобактерий. В связи с этим возник вопрос относительно того, каким образом могут быть связаны оба процесса – гидролиз пептидогликана клеточной стенки и реактивация. То, что оба процесса связаны следовало из экспериментов по изучению реактивации покоящихся клеток *M. smegmatis*, трансформированных плазмидой pAG, несущей ген *rpf* (штамм pAGR) и гены *rpf* с мутациями (мутантные штаммы AGX). Были получены результаты очень близкие к исследованию энзиматической активности рекомбинантных белков с соответствующими заменами аминокислот (см. Раздел III). Так, замена в активном центре белка RpfC *M. tuberculosis* (Rv1884c) глута-

мата на глутамин (E54Q) приводила лишь к некоторому снижению реактивации, тогда как замена глутамата на аланин и особенно лизин вызывала резкое снижение реактивации. Замена цистеинов (C53K и C114T) по отдельности приводила к частичному снижению реактивации, тогда как их совместная замена приводила к полному подавлению реактивирующей способности белка. Таким образом, кроме глутамата, выполняющего важную роль в катализе, для реактивации важна также стабилизирующая функция двух остатков цистеина в молекуле [24, 25]. Эти результаты прямо подтверждают связь ферментативной активности белков Rpf с реактивацией покоящихся, НК бактерий.

Однако вопрос о природе взаимосвязи гидролитической и реактивирующей способности Rpf долгое время оставался открытым. На сегодняшний день, на наш взгляд, можно выделить три гипотезы механизма действия белка Rpf:

I). Возможно Rpf в качестве гидролазы осуществляет ограниченный гидролиз модифицированного пептидогликана в покоящихся клетках, что способствует синтезу и росту клеточной стенки, а также началу деления в НК-клетках.

Пептидогликан микобактерий состоит из чередующихся остатков сахаров N-ацетилглюкозамина и остатков мурамовой кислоты (либо N-ацетил-, либо N-гликолил), к которым присоединены пентапептидные боковые цепи [46–49]. При переходе в состояние покоя происходит увеличение количества межмолекулярных связей в структуре пептидогликана, а также его уплотнение и утолщение [46, 47, 50, 51]. В то же время микобактериальный пептидогликан активно-растущих клеток является чрезвычайно динамической структурой, постоянно увеличивающейся и подвергающейся ремоделингу в процессе роста [48, 52]. Поэтому ограниченный гидролиз ПГ у покоящихся клеток может являться критическим для начала деления. Однако мишень для экзогенного Rpf – пептидогликан, расположенный под слоем внешней микобактериальной мембраны [44] и его доступность, особенно в покоящихся клетках для экзогенного Rpf проблематична. В то же время эндогенный Rpf способен выполнять эту функцию. Некоторым подтверждением этого предположения является тот факт, что экспрессия синтеза молекул Rpf наблюдается не в начале реактивации, а лишь спустя определенное время, когда в клетках появляется транскрипционная и трансляционная активность – непосредственно перед началом деления [45]. Это также опровергает первоначальное предположение о принадлежности Rpf к классу цитокинов, запускающих процесс реактивации на начальных стадиях [6].

II). Второе предположение о механизме действия Rpf основано на обнаруженной способности рекомбинантного Rpf разрушать бактериальные агрегаты, что, вероятно, также определяется его гидролитической активностью [46]. Ранее было обнаружено, что агрегация клеток *M. luteus* играет важную роль в инициации роста культуры в лаг-фазе [47], а также на начальных этапах реактивации МТВ [48]. Возможно, что белки Rpf участвуют в разрушении этих агрегатов перед началом деления.

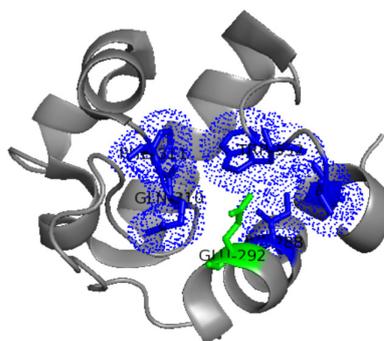
III) Наконец, согласно «сигнальной гипотезе» в процессе гидролиза пептидогликана, Rpf может высвобождать низкомолекулярные молекулы, передающие сигнал как на саму клетку, так и на соседние клетки, действуя на некий поверхностный клеточный рецептор.

Как обсуждалось выше, белки Rpf способны гидролизовать 1→4 гликозидные связи бактериального пептидогликана. Долгое время, однако, было непонятно, какие продукты образуются в ходе гидролиза, поскольку было неясно к какой группе ферментов принадлежит Rpf: к группе лизоцимов или к группе литических трансгликозилаз. Классификация известных пептидогликангидролаз основана на специфичности расщепления структурных сайтов бактериального пептидогликана [42]: например, N-ацетилмурамил-L-аланин амидаза гидролизует амидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином, освобождая цепь гликана от фрагмента пептида, в то время, как карбокси- и эндопептидазы разрушают LD-, DD-, DL- связи в фрагменте пептида. Выделяют три типа ферментов гликозидаз, расщепляющих гликановый остов по остаткам N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина: N-ацетилглюкозаминидазы, лизоцимы и литические трансгликозилазы. Последние два фермента разрушают одну β-(1→4)-гликозидную связь гликана, поэтому лизоцимы и литические трансгликозилазы известны под общим названием N-ацетил-β-D-мурамидаз. Следует также отметить, что активность гидролаз специфична по отношению к определенному типу гликана, в частности, по наличию или отсутствию модификаций гликана, числа поперечных сшивок и т.д. [48, 23].

Детальное сравнение структуры каталитических центров белков показывает наличие консервативного остатка глутаминовой кислоты у RpfB *M. tuberculosis* (Glu²⁹² RpfB соответствует Glu³⁵ с-лизоцима). Каталитический глутамат RpfB, аналогично лизоциму окружен «гидрофобным карманом». Гидрофобное окружение создается аминокислотами боковой цепи: Ile²⁸⁸, Gln³¹⁰, Phe³¹¹, Trp³⁵², и Val³⁵⁴, которые стабилизируют протонированное, незаряженное состояние Glu²⁹² в оптимуме действия фермента (рН 5.0), что делает глутамат «сильной кислотой» в процессе протекания акта катализа (рис. 5). Как

Рис. 5. Организация «гидрофобного кармана» каталитического центра белка RpfB.

Гидрофобное окружение создается аминокислотами боковой цепи: Phe288, Gln310, Phe311, Trp352, и Val354 (изображены синим), которые стабилизируют протонированное, незаряженное состояние Glu292 (изображен зеленым цветом).



было недавно показано, что подобная организация структуры также характерна и для организации гидрофобного кармана и для RpfC, что однозначно может свидетельствовать об общности организации и строения всех белков класса Rpf [15]. Следует отметить, что RpfB, в отличие от лизоцима, не имеет эквивалента Asp⁵² с-лизоцима (на месте которого у RpfB расположен Tyr³⁰⁵). Это позволило предположить, что белок Rpf, функционально принадлежит к группе литических трансгликозилаз – группе ферментов – гидролаз, расщепляющих бактериальный пептидогликан с высвобождением ангидро-продуктов реакции [57, 58]. Однако экспериментальные доказательства образования этих продуктов были получены позже (см. ниже).

Многие ферменты, вовлеченные в синтез и деградацию пептидогликана, функционируют в комплексе с другими ферментами. Скринингом в двухгибридной дрожжевой системе было обнаружено, что RpfB MТВ имеет партнера – эндопептидазу RipA (*resuscitation promoting factor interacting protein*) [59–61]. RipA – L, D-эндопептидаза – протеолитический фермент, способный расщеплять пептидные связи внутри пептидной цепи пептидогликана (гидролизует D-глутамин-мезо-диаминопимелиновую кислоту на изоглутамин (D-iGln) и мезодиаминопимеленовую кислоту (m-DAP)). RipA может также взаимодействовать с RpfE [51]. RipA – секретируемый белок, который был обнаружен у целого ряда микобактерий, включая патогенные формы, найден также у родоккокков и коринобактерий. Каталитический домен RipA содержит в «core» 70 аминокислот (385–445), которые имеют 35% сходство с цистеиновой протеазой NlpC/P60 семейства. Локализация обоих белков (RpfB и RipA) на септе делящихся клеток предполагает согласованную роль этих ферментов в клеточном делении [59–63]. Было показано, что делеция гена, кодирующего RipA, приводит к уменьшению скорости роста

и аномальной морфологии клеток *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* (ветвление и образование цепочек). Образование длинных ветвящихся цепей происходит из-за незавершенности образования септы и приводит к повышению чувствительности клеток к β -лактамам антибиотикам. Эти данные позволяют предположить, что RipA играет основную роль в финальной стадии клеточного деления. Поскольку RpfB способен гидролизовать гликозидную связь между остатками N-ацетилглюкозамина и N-ацетил(гликолил) мурамовой кислоты, а RipA, является эндопептидазой, активной по сайтам D-Glu-мезо-DAP пептидного остова микобактериального пептидогликана, то их взаимодействие должно приводить к синергетическому гидролизу бактериальной клеточной стенки (рис. 6), что было продемонстрировано экспериментально [54].

Было также установлено, что совместное действие RpfB и RipA приводит к увеличению степени гидролиза флуоресцентно-меченого пептидогликана *M. smegmatis*, по сравнению с гидролизом ПГ по действием индивидуальных белков RpfB и RipA [64, 65]. Аналогичным образом, совместное добавление RpfB и RipA выявляло синергетический эффект потенцирования реактивационной активности по отношению к покоящимся НК клеткам *M. smegmatis* [55].

Теоретически совместное действие RpfB и RipA должно было приводить к высвобождению дисахарида-дипептида [55]. Применение метода масс-спектрометрии (MALDI-TOF) позволило установить структуру продукта синергетического гидролиза микобактериального пептидогликана под действием двух ферментов RpfB и RipA (рис. 6б). Как оказалось, в результате реакции образуется N-ацетилглюкозаминил- $\beta(1\rightarrow4)$ -N-гликолил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат (*ангидроГМДП*), что подтвердило гипотезу принадлежности белка Rpf к литическим трансгликозилазам [55].

Обнаружение низкомолекулярных продуктов, образующихся под действием комбинации Rpf и Rip, позволяет рассматривать именно ангидромуропептиды в качестве промежуточных потенциально сигнальных молекул. Действительно, в экспериментах, использование синтетического аналога (N-ацетилглюкозаминил- $\beta(1\rightarrow4)$ -N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-глутамата) подтвердило реактивационную способность этого соединения (в концентрациях около 100 нг/мл) стимулировать реактивацию НК клеток микобактерий [55].

Как известно, мурупептиды рассматриваются в качестве потенциальных сигнальных молекул, вовлеченных в формирование молекулярных каскадов «паразит-хозяин» [43]. Недавно в работе Шаха с

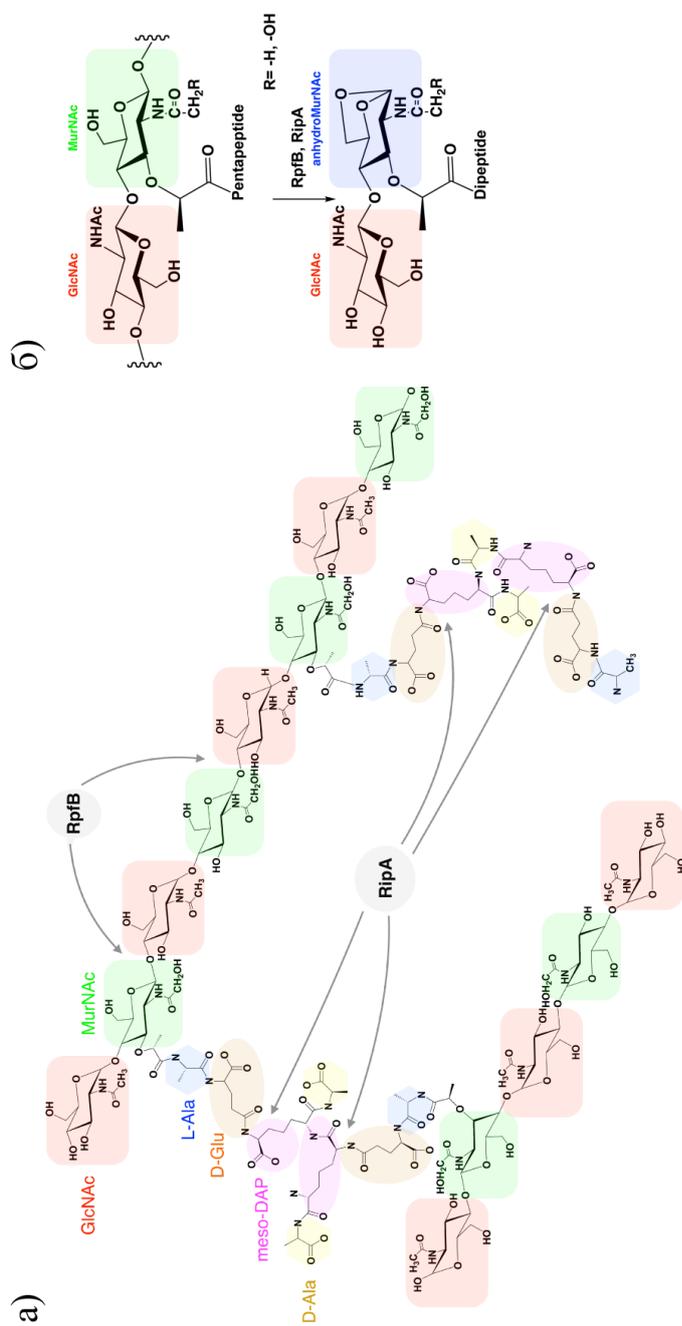


Рис. 6. Структурная организация микобактериального пептидогликана и его гидролиз.
 а) Сights гидролиза микобактериального ПГ под действием RpfB и RipA;
 б) Предполагаемый продукт, образуемый в процессе гидролиза – ангидро-дисахарид-дипептид.

соавторами была выявлена роль муропептидов, образуемых в процессе гидролиза пептидогликана под действием мутанолизина, в качестве сигнальных молекул в процессе прорастания эндоспор *Bacillus subtilis* [56]. Согласно предложенной авторами схеме, муропептиды взаимодействовали с внешним, специфическим рецептором – PASTA доменом мембранной серин-треонин протеинкиназы PrkC, активируя ее и тем самым и вызывая последующее фосфорилирование регуляторных клеточных белков [56]. Только мезо-DAP-содержащие муропептиды, которые освобождаются во время активного роста бактерий, способствовали прорастанию спор *B. Subtilis* [60]. Примечательно, что ген *prkC* контролирует экспрессию предполагаемого гомолога белка Rpf – YocH *B. subtilis*, и соответственно может регулировать высвобождение муропептидов под действием активности YocH [57]. *M. tuberculosis* имеет гомолог PrkC – серин-треонин киназу PknB – одну из 11 серин-треонин протеинкиназ [65, 68]. Соответственно можно предположить, что муропептиды, образующиеся в процессе ферментативного гидролиза под действием RipA и RpfB могут взаимодействовать с данной протеинкиназой аналогичным путем. Регулятор PknB является essentialным для роста патогена *M. tuberculosis* и сапрофита *M. smegmatis* [65]. Сверхэкспрессия PASTA домена PknB (структурного аналога PASTA-домена PrkC) задерживает рост обеих бактерий [66]. PknB и PknA регулируют форму клеток и, возможно, клеточное деление микобактерий, связанное с обратимым фосфорилированием внутриклеточных белков [67].

PknB контролирует основные метаболические пути через фосфорилирование белковых субстратов: белковый регулятор GagA, который в нефосфорилированной форме ингибирует α -кетоглутарат декарбоксилазу в ЦТК [69], KasA/B белки, вовлеченные в биосинтез миколовых кислот [70], факторы вирулентности RshA и SigH, Wag31 белок, принимающий участие в клеточном делении [68, 71], ферменты биосинтеза клеточной стенки GlmU [72] и PBPА [73]. Вероятно, PASTA домен узнает растущие цепи пептидогликана и регулирует распределение белков, вовлеченных в деление и формирование септы. Взаимодействие PASTA домена PknB с клеточной стенкой является важным процессом и может служить механизмом для контроля целостности клеточной стенки и роста бактерий [59].

Из известных субстратов фосфорилирования микобактериальной PknB представляют интерес белки, вовлеченные в процесс клеточного деления Wag31 и PpbA, которые, вероятно, могут принимать участие на ранних стадиях реактивации покоящихся клеток [60].

Была предложена молекулярная модель активации PknB, основанная на димеризации внеклеточного домена под действием муропептидов [58], также было изучено связывание синтезированных муропептидов с внеклеточным доменом PknB методом плазмонного резонанса [50]. Однако в исследованиях серин-треонин протеинкиназы PrkC из *S. aureus* было обнаружено, что данная киназа неспособна к димеризации в присутствии даже больших концентраций муропептидов [61], однако авторы не исключают такой возможности *in vivo*, при этом, вероятно, в данный процесс могут быть вовлечены и прочие молекулярные игроки [61].

И хотя вовлеченность протеинкиназы PknB в передачу сигнала через муропептиды является недоказанным, но интересным предположением, сигнальный механизм действия белков Rpf посредством муропептидов является вполне правдоподобным.

На самом деле нельзя исключить реализацию нескольких предполагаемых механизмов, например распад бактериальных агрегатов под действием Rpf [46] может предшествовать последующему образованию муропептидов, запускающих процесс реактивации (рис. 7). С другой стороны, возможно, эти процессы могут протекать и параллельно. Например, очевидно, субстратом для действия белков Rpf могут служить фрагменты пептидогликана, всегда присутствующие в бактериальных культурах [72, 73]. В настоящее время представляется, что процесс реактивации покоящихся форм является сложным явлением, включающим несколько стадий. Похоже, что первая стадия (стадия метаболической активации) связана с повышением уровня внутриклеточного цАМФ, которое происходит в результате активации аденилатциклазы. Было обнаружено, что повышение уровня цАМФ и активация метаболизма, предшествует размножению клеток, а также предшествует экспрессии *rpfA*, которая возрастает к началу деления клеток [37]. Таким образом, действие эндогенных белков Rpf способно стимулировать непосредственно деление микобактериальных клеток, в то же время способствуя образованию низкомолекулярных продуктов (муропептидов) – индукторов ранних стадий процесса реактивации [62].

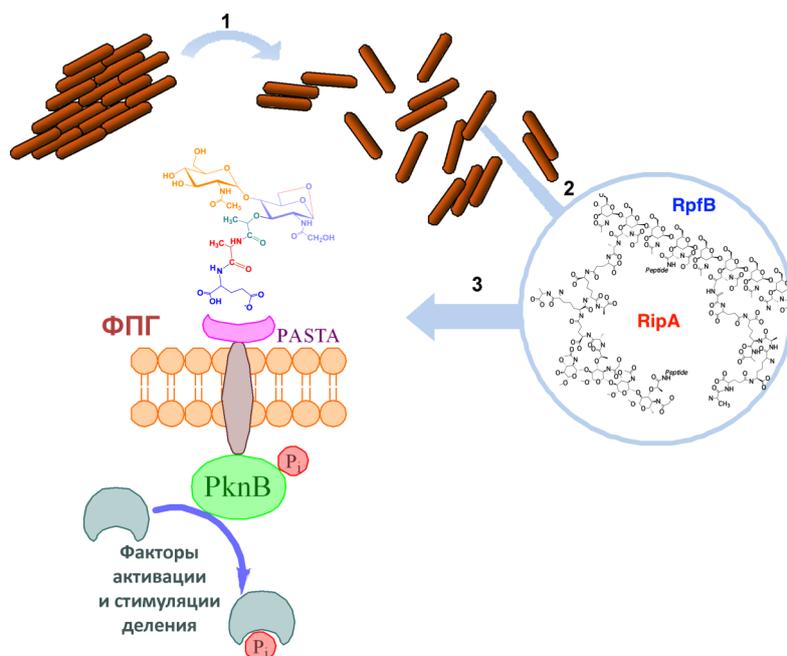


Рис. 7. Возможный путь реактивации покоящихся форм микобактерий.

1 – белок Rpf вызывает распад клеточных агрегатов; 2 – при совместном действии белков Rpf, Rip на микобактериальный пептидогликан высвобождаются ФПГ – муропептиды; 3 – ФПГ связываются с поверхностным рецептором PASTA-доменом серин-треонин протеинкиназы PknB.

VI. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ RPF В МЕДИЦИНЕ

РАЗРАБОТКА АНТИТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Во многих публикациях белки Rpf связывают с латентной формой туберкулеза, и переходом этой формы в активный туберкулёз [29, 34, 37, 74, 74]. Проблема латентного туберкулёза становится актуальной при использовании иммуносупрессивной терапии, когда побочным эффектом является реактивация латентной формы [76, 77]. В связи с вышеупомянутой ролью белков Rpf в реактивации покоящихся форм, подходы для ингибирования активности Rpf выглядят привлекательными для борьбы с реактивацией латентного ТБ. Среди таких подходов можно упомянуть применение моноклональных антител

против RpfВ домена, которые ингибировали стимулирующий эффект Rpf по отношению к размножению МТБ *in vivo* [65].

Обнаружение энзиматической активности белка Rpf позволяет проводить отбор соединений с потенциальной ингибиторной активностью, которые могли бы рассматриваться в качестве потенциальных анти-туберкулезных препаратов. Ранее сообщалось о существовании двух ингибиторов литических трансгликозилаз булгицине и NAG-тиазолине, которые однако никогда не тестировались по отношению к грамположительным бактериям [79, 80]. Кроме того, NAG-тиазолины не обладали выраженным ингибиторным эффектом и проявляли активность лишь в высоких концентрациях [66]. В этой связи оказалось перспективным использование нитрофенилтиоцианатов (НФТ), которые были способны подавлять прорастание грибных спор. Знание о том, что в процессе прорастания спор ключевые функции выполняют гидролитические ферменты, в частности, литические трансгликозилазы и хитиназы, позволило рассматривать новый класс нитрофенилтиоцианатов в качестве ингибиторов таких гидролаз [81–83]. Было предположено, что НФТ могут быть активными по отношению к белкам Rpf. Исследование взаимодействия некоторых НФТ методом тушения белковой автофлуоресценции позволило установить, что ингибиторы данного класса, очевидно, взаимодействуют с остатками ароматических аминокислот (Trp³⁵², Tyr³⁰⁵) и препятствуют связыванию субстрата Rpf (фрагментов пептидогликана) с его активным центром [69]. Далее было также выяснено, что соединения этого класса способны ингибировать реакцию гидролиза как синтетического субстрата 4-MUF-3-NAG, так и флуоресцентно-меченого микобактериального пептидогликана под действием Rpf [69]. При исследовании биологических свойств НФТ на Rpf-продуцирующих микроорганизмах (*M. luteus*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*) было обнаружено, что они способны ингибировать рост бактерий и подавлять процесс реактивации покоящихся форм микобактерий, увеличивая время реактивации и уменьшая число жизнеспособных клеток на последних этапах реактивации (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*) [57, 83]. Кроме того, был обнаружен эффект НФТ подавления реактивации латентной туберкулезной инфекции *in vivo* на мышинной модели после иммуносупрессии аминогуанидином [49]. Несмотря на то, что наблюдаемые эффекты ингибирования происходили при достаточно высоких концентрациях соединений, и некоторые клетки в популяции НК форм, по-прежнему, были способны реактивироваться, НФТ можно рассматривать в качестве перспективного класса молекул, модификация которых позволит

создать эффективные препараты, предотвращающие реактивацию латентного ТБ.

В связи с трудностью эрадикации покоящихся форм возбудителя туберкулёза в хозяине (обычные антибиотики не действуют на такие формы [84, 85]), была сформулирована идея об использовании Rpf для перевода НК клеток МТБ в органах хозяина в активное состояние, когда они могут быть подавлены антибиотиками [86, 87]. Эта идея в прямом виде была опубликована в 2013 г, однако до сих пор не была реализована. Одна из трудностей состоит в том, что неясно, каким образом вводить нестойкий рекомбинантный белок в организм хозяина. Другая проблема состоит в определенной опасности реактивировать резистентный к антибиотикам штамм МТБ, чего нельзя предсказать заранее до реактивации.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Обнаружение у МТБ пяти ортологов Rpf (Rpf A–E), четыре из которых согласно предсказаниям являются секретлируемыми белками, привело к предположению о том, что эти белки могут распознаваться иммунной системой хозяина и быть протекторами при создании новых защитных вакцин. Особую привлекательность имело использование белков Rpf для стимулирования иммунного ответа против латентного туберкулеза и его реактивации. Действительно, в более поздних работах после открытия белков Rpf было выявлено, что соответствующие пяти ортологам мРНК были обнаружены в тканях (легких) зараженных мышей кроликов и людей [34, 88, 89]. Использование антител против RpfB позволило обнаружить соответствующий белок в тканях (лимфатические узлы кишечника) туберкулезных больных. В этом случае белок локализовался в центрах некроза, в гигантских клетках и макрофагах [74].

Иммунологические исследования продемонстрировали способность двух из пяти белков Rpf МТБ (Rpf A и Rpf D) стимулировать продукцию гамма-интерферона Т-клетками в крови заболевших туберкулезом больных, что свидетельствовало о распознавании этих антигенов иммунной системой. Интересно, что иммунный ответ был более выражен у пациентов с латентной формой туберкулёза, чем у больных с активным туберкулезом [75]. Эти результаты открывают возможность использования белков Rpf для применения как в серодиагностике, так и для диагностики туберкулеза в реакциях клеточного ответа.

Применение белков Rpf в качестве профилактических субъединичных вакцин было исследовано на модели мышинного туберку-

леза. Было выявлено снижение числа бактерий после заражения у иммунизированных животных [76]. На сходной модели было продемонстрировано, что вакцинация животных ДНК вакцинами, кодирующими синтез белков RpfB и RpfD имеет максимальный протективный ответ, выраженный в снижении числа бактерий в легких после заражения [77]. Применение 4 из 5 рекомбинантных белков Rpf МТБ в качестве субъединичных вакцин выявило их способность вызывать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ у мышей. Вакцинация мышей этими белками приводила к существенному уровню протекции при заражении вирулентным штаммом МТБ, которое выражалось как в виде увеличения продолжительности жизни животных, так и в существенном снижении размножения патогена в органах (легкие и селезенка) [78]. Другой подход связан с конструированием аттенуированных штаммов *M. tuberculosis* для использования их в качестве живых вакцин. В данном случае были созданы нокаутированные штаммы МТБ с делециями от 2-х до 4-х генов Rpf. В результате таких делеций штаммы теряли вирулентность, но были способны защищать иммунизированных мышей после заражения вирулентным штаммом [79]. Разумеется, разработка и апробация новых противотуберкулезных вакцин требует длительного времени и приведенные выше эксперименты являются лишь первыми шагами в этом направлении. В частности, известная биотехнологическая компания Aeras, специализирующаяся на разработке новых антитуберкулезных вакцин, сообщила об экспериментальном исследовании новой вакцины на основе рекомбинантной BCG, экспрессирующей три белка Rpf МТБ наряду с другими антигенами [80].

ПРИМЕНЕНИЕ RPF ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА В БИОМАТЕРИАЛЕ ПАЦИЕНТОВ

Реактивирующие свойства Rpf по отношению к покоящимся микобактериям нашло интересное применение в диагностических исследованиях. Ранее было известно, что при микробиологическом исследовании образцов мокроты, взятых от больных ТБ, нередко наблюдаются ложно-негативные результаты, т.е. отсутствие роста возбудителя на стандартных средах. Как становится ясно теперь, вполне вероятно, что это связано с нахождением в мокроте клеток МТБ в НК состоянии. Такая популяция покоящихся клеток была впервые обнаружена Мукамоловой и сотр. в 2010 [81]. Было выявлено, что значительная часть клеток в мокроте могла быть реактивирована с помощью добавления Rpf в среду реактивации [81]. Позже, схожий

эффект был обнаружен при реактивации образцов мокроты в жидкой среде при добавлении культуральной жидкости, полученной от растущих МТБ клеток [82] или клеток *M. luteus* [83]. Интересно, что максимальный реактивирующий эффект культуральной жидкости, предположительно содержащий Rpf, проявлялся для медленно реактивирующихся культур, т.е. для клеток, находящихся в состоянии глубокого покоя [82]. К сожалению, в этих исследованиях не было проведено детального изучения супернатанта активных бактерий, необходимого для получения максимального результата (прежде всего возраст культуры, состав среды), что может быть важным фактором для подобных экспериментов (М.О.Шлеева, персональное сообщение). Очень близкий результат был получен при исследовании мокроты больных с применением рекомбинантных белков Rpf E и B, позволяющих стимулировать рост покоящихся бактерий в образцах для уменьшения времени необходимого для диагностики возбудителя [84].

Таким образом, белки семейства Rpf могут найти применение для улучшения диагностики туберкулеза и снижения ложно-отрицательных результатов из-за трудностей культивирования возбудителя.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прошло 18 лет со времени первой публикации о белке Rpf у *M. luteus* как о секретуруемом факторе, стимулирующим реактивацию покоящихся форм этой неспорулирующей бактерии [6]. За это время был совершен существенный прогресс в понимании распространённости подобных белков, их природы, структуры и функции. В настоящее время установлено, что белки Rpf на самом деле являются обширным семейством и широко представлены в грамположительных бактериях филума *Actinobacteria*. Структурные исследования позволили предположить, что консервативный домен в белках этого семейства представляет собой гибрид лизоцима и бактериальной литической трансгликозилазы и, что, таким образом белки Rpf, очевидно, обладают ферментативными свойствами. Впоследствии это предположение было подтверждено в целом ряде экспериментальных исследований, которые позволили отнести их к классу пептидогликангидролаз-литических трансгликозилаз: ферментов, принимающих участие в ремоделинге бактериальной стенки. Как оказалось, белки Rpf у многих бактерий представлены в виде нескольких ортологов, причем функционально *in vitro* эти ортологи, по крайней мере частично, взаимозаменяемы. В многочисленных пуб-

ликациях была доказана реактивирующая роль белков Rpf по отношению к покоящимся и стрессированным клеткам различных видов актинобактерий на моделях *in vitro*. Особое внимание уделяется роли белков рассматриваемого семейства у микобактерий, в частности МТБ. В этих работах была установлена связь между реактивацией возбудителя туберкулеза из покоящегося состояния как в моделях *in vitro*, так и в организме хозяина и экспрессией белков Rpf.

Несмотря на очевидный прогресс, тем не менее, механизмы стимулирующего рост и реактивацию действия белков Rpf остаются до конца невыясненными. Достаточно ли для проявления реактивирующего эффекта ферментативная активность белков Rpf сама по себе? Или в качестве промежуточной сигнальной молекулы выступают продукты ферментативного действия Rpf (мулопептиды)? Если верно первое предположение, то возникает вопрос какова последовательность событий между гидролизом пептидогликана и стимуляцией размножения? Если верно второе предположение, то каковы механизмы передачи сигнала? Эти вопросы пока не имеют ответов и ждут экспериментального изучения.

Белки семейства Rpf, очевидно, имеют целый ряд медицинских применений. Это связано, прежде всего, с изучением механизмов латентного туберкулеза – распространенного заболевания, потенциально опасного неконтролируемой реактивацией и переходом в активную форму туберкулеза. Использование нокаутных по генам *rpf* штаммов МТБ позволило экспериментально доказать, что белки Rpf определяют способность таких штаммов к установлению латентного состояния у животных и к реактивации с развитием активного туберкулезного процесса. Таким образом, семейство Rpf является, очевидно, важным фактором в патогенезе латентного туберкулеза.

С другой стороны, обнаружение распознавания белков Rpf иммунной системой хозяина позволяет использовать эти белки в качестве диагностических антигенов и в качестве основы для создания субъединичных профилактических вакцин. Наконец, реактивирующая функция белков Rpf позволяет применять их для улучшения микробиологической диагностики туберкулеза в биологических образцах (выявление некультивируемых форм микобактерий). В настоящее время перечисленные возможности использования белков Rpf уже реализуются, по крайней мере, на уровне экспериментальных работ. В дальнейшем эти исследования могут привести к созданию новых вакцин и диагностических тестов для использования в практической медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M. (2003) Adoption of the transiently non-culturable state - A bacterial survival strategy? *Adv. Microb. Physiol.*, **47**, 65–129.
2. Kaprelyants, A.S., Gottschal, J.C., Kell, D.B. (1993) Dormancy in non-sporulating bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **104**, 271–286.
3. Votyakova, T.V., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B. (1994) Influence of Viable Cells on the Resuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended Stationary Phase: the Population Effect, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3284–3291.
4. Kaprelyants, A.S., Kell, D.B. (1993) Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3187–3196.
5. Kaprelyants, A.S., Mukamolova, G.V., Kell, D.B. (1994) Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution, *FEMS Microbiol. Lett.*, **115**, 347–352.
6. Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Kell, D.B. (1998) A bacterial cytokine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8916–8921.
7. Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M. (2002) The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor, *Mol. Microbiol.*, **46**, 611–621.
8. Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H.R., Chandra, G., Chater, K.F., Dover, L.G., Goh, E.B., Kahan, T., Kaprelyants, A.S., Kyrpides, N., Lapidus, A., Lowry, S.R., Lykidis, A., Mahillon, J., Markowitz, V., Mavromatis, K., Mukamolova, G.V., Oren, A., Rokem, J.S., Smith, M.C., Young, D.I., Greenblatt, C.L. (2010) Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium, *J. Bacteriol.*, **192**, 841–60.
9. Ravagnani, A., Finan, C.L., Young, M. (2005) A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement, *BMC Genomics*, **6**, 39.
10. Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Asakura, H., Makino, S.I. (2006) Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2, *Int. J. Food Microbiol.*, **106**, 241–247.
11. Bateman, A., Bycroft, M. (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD), *J. Mol. Biol.*, **299**, 1113–1119.
12. Cohen-Gonsaud, M., Keep, N.H., Davies, AP, Ward, J, Henderson, B, Labesse, G. (2004) Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 7–10.
13. Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagn eris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C., Keep N.H. (2005) The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 270–273.
14. Ruggiero, A., Tizzano, B., Geerlof, A., Pedone, E., Pedone, C., Wilmanns, M., Berisio, R. (2007) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a resuscitation-promoting factor from *Mycobacterium tuberculosis*

- bacterium tuberculosis, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **63**, 870–873.
15. Maione, V., Ruggiero, A., Russo, L., De Simone, A., Pedone, P.V., Malgieri, G., Berisio, R., Isernia, C. (2015) NMR Structure and Dynamics of the Resuscitation Promoting Factor RpfC Catalytic Domain, *PLoS One.*, **10**, e0142807.
 16. Ruggiero, A., Tizzano, B., Pedone, E., Pedone, C., Wilmanns, M., Berisio, R. (2009) Crystal Structure of the Resuscitation-Promoting Factor (DeltaDUF)RpfB from *M. tuberculosis*, *J. Mol. Biol.*, **385**, 153–162.
 17. Ruggiero, A., Marchant, J., Squeglia, F., Makarov, V., De Simone, A., Berisio, R. (2013) Molecular determinants of inactivation of the resuscitation promoting factor B from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **31**, 195–205.
 18. Bateman, A., Holden, M.T., Yeats, C. (2005) The G5 domain: A potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation, *Bioinformatics*, **21**, 1301–1303.
 19. Ruggiero, A., Squeglia, F., Romano, M., Vitagliano, L., De Simone, A., Berisio, R. (2016) The structure of Resuscitation promoting factor B from *M. tuberculosis* reveals unexpected ubiquitin-like domains, *Biochim. Biophys. Acta – Gen Subj.*, **1860**, 445–451.
 20. Vollmer, W. (2008) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 287–306.
 21. Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Young, M. (2006) Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation, *Mol. Microbiol.*, **59**, 84–98.
 22. Telkov, M.V., Demina, G.R., Voloshin, S.A., Salina, E.G., Dudik, T.V., Stekhanova, T.N., Mukamolova, G.V., Kazaryan, K.A., Goncharenko, A.V., Young, M., Kaprelyants, A.S. (2006) Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases, *Biochemistry*, **71**, 414–422.
 23. Thunnissen, A.M., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Rozeboom, H.J., Engel, H., Keck, W., Dijkstra, B.W. (1994) Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography, *Nature*, **367**, 750–753.
 24. Grutter, MG, Weaver, LH, Matthews, BW (1983) Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? *Nature*, **303**, 828–831.
 25. Mukamolova, G.V., Kormer, S.S., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S. (1999) Stimulation of the multiplication of *Micrococcus luteus* by an autocrine growth factor. *Arch Microbiol* **172**, 9–14.
 26. Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Young, D.I., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M. (2002) A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol.*, **46**, 623–635.
 27. Shleeva, M.O., Bagramyan, K., Telkov, M.V., Mukamolova, G.V., Young, M., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S. (2002) Formation and resuscitation of «non-culturable» cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase, *Microbiology*, **148**, 1581–1591.
 28. Shleeva, M., Mukamolova, G.V., Young, M., Williams, H.D., Kaprelyants, A.S. (2004) Formation of «non-culturable» cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under

- suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology*, **150**, 1687–1697.
29. Biketov, S., Mukamolova, G.V., Potapov, V., Gilenkov, E., Vostroknutova, G., Kell, D.B., Young, M., Kaprelyants, A.S. (2000) Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **29**, 233–240.
30. Downing, K.J., Betts, J.C., Young, D.I., McAdam, R.A., Kelly, F., Young, M., Mizrahi, V. (2004) Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five rpf-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* show functional redundancy, *Tuberculosis*, **84**, 167–179.
31. Tufariello, J.M., Jacobs, W.R., Chan, J. (2004) Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo, *Infect. Immun.*, **72**, 515–526.
32. Downing, K.J., Mischenko, V.V., Shleeva, M.O., Young, D.I., Young, M., Kaprelyants, A.S., Apt, A.S., Mizrahi, V. (2005) Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro, *Infect. Immun.*, **73**, 3038–3043.
33. Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K.J., Sung, N., Vostroknutova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., Mizrahi, V. (2008) The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro, *Mol. Microbiol.*, **67**, 672–684.
34. Hartmann, M., Barsch, A., Niehaus, K., Pühler, A., Tauch, A., Kalinowski, J. (2004) The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular communication of *Corynebacterium glutamicum*, *Arch. Microbiol.*, **182**, 299–312.
35. Tufariello, J.M., Mi, K., Xu, J., Manabe, Y.C., Kesavan, A.K., Drumm, J., Tanaka, K., Jacobs, W.R. Jr, Chan, J. (2006) Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis, *Infect. Immun.*, **74**, 2985–2995.
36. Gupta, R.K., Srivastava, B.S., Srivastava, R. (2010) Comparative expression analysis of rpf-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under different physiological stress and growth conditions, *Microbiology*, **156**, 2714–2722.
37. Shleeva, M., Goncharenko, A., Kudykina, Y., Young, D., Young, M., Kaprelyants, A. (2013) Cyclic AMP-dependent resuscitation of dormant *Mycobacteria* by exogenous free fatty acids, *PLoS One*, **8**, e82914.
38. Rickman, L., Scott, C., Hunt, D.M., Hutchinson, T., Menéndez, M.C., Whalan, R., Hinds, J., Colston, M.J., Green, J., Buxton, R.S. (2005) A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the rpfA gene coding for a resuscitation promoting factor, *Mol. Microbiol.*, **56**, 1274–1286.
39. Raman, S., Hazra, R., Dascher, C.C., Husson, R.N. (2004) Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor

- SigD and its role in virulence, *J. Bacteriol.*, **186**, 6605–6616.
40. Keep, N.H., Ward, J.M., Cohen-Gonsaud, M., Henderson, B. (2006) Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states, *Trends Microbiol.*, **14**, 271–276.
41. Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., Vollmer, W. (2011) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 123–136.
42. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 259–286.
43. Boneca, I.G. (2005) The role of peptidoglycan in pathogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 46–53.
44. Bansal-Mutalik, R., Nikaido, H. (2014) Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4958–4963.
45. Gupta, R.K., Srivastava, B.S., Srivastava, R. (2010) Comparative expression analysis of rpf-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under different physiological stress and growth conditions. *Microbiology* **156**, 2714–2722.
46. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Kaprelyants, A.S. (2011) Effect of secreted Rpf protein on intracellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures, *Microbiology*, **80**, 143–149.
47. Волошин С. А., Капрельянц А. С. (2005) Изучение клеточной агрегации в культурах *Micrococcus luteus* методом динамического светорассеяния, *Прикладная биохимия и микробиология*, **74**, 420–427.
48. Шлеева М.О., Мукамолова Г.В., Телков М.В., Березинская Т.Л., Сыроешкин А.В., Бикетов С.Ф., Капрельянц А.С. (2003) Образование «некультивируемых» клеток *Mycobacterium tuberculosis* и их оживление, *Микробиология*, **72**, 76–83.
49. Kaprelyants, A.S., Mukamolova, G.V., Ruggiero, A., Makarov, V.A., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Potapov, V.D., Shramko, P.A. (2012) Resuscitation-promoting factors (Rpf): in search of inhibitors, *Protein Pept. Lett.*, **19**, 1026–1034
50. Scheurwater, E., Reid, C.W., Clarke, A.J. (2008) Lytic transglycosylases: Bacterial space-making autolysins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 586–591.
51. Hett, E.C., Chao, M.C., Steyn, A.J., Fortune, S.M., Deng, L.L., Rubin, E.J. (2007) A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol.*, **66**, 658–668.
52. Ruggiero, A., Squeglia, F., Esposito, C., Marasco, D., Pedone, E., Pedone, C., Berisio, R. (2010) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the resuscitation promoting factor interacting protein RipA from *M. tuberculosis*, *Protein Pept. Lett.*, **17**, 70–73.
53. Kana, B.D., Mizrahi, V. (2010) Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **58**, 39–50.
54. Hett, E.C., Chao, M.C., Deng, L.L., Rubin, E.J. (2008) A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathog.*, **4**(2), e1000001.
55. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Guryanova, S.V., Ruggiero, A., Berisio, R., Kaprelyants, A.S. (2015) A product of

- RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria, *FEBS J.*, **282**, 2500–2511.
56. Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., Dworkin, J. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments, *Cell*, **135**, 486–496.
 57. Shah, I.M., Dworkin, J. (2010) Induction and regulation of a secreted peptidoglycan hydrolase by a membrane Ser/Thr kinase that detects muropeptides, *Mol. Microbiol.*, **75**, 1232–1243.
 58. Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., Cohen-Gonsaud, M. (2010) The structure of PknB extracellular PASTA domain from mycobacterium tuberculosis suggests a ligand-dependent kinase activation, *Structure*, **18**, 606–615.
 59. Dasgupta, A., Datta, P., Kundu, M., Basu, J. (2006) The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division, *Microbiology*, **152**, 493–504.
 60. Molle, V., Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way, *Mol. Microbiol.*, **75**, 1064–1077.
 61. Ruggiero, A., Squeglia, F., Marasco, D., Marchetti, R., Molinaro, A., Berisio, R. (2011) X-ray structural studies of the entire extracellular region of the serine/threonine kinase PrkC from *Staphylococcus aureus*, *Biochem. J.*, **435**, 33–41.
 62. Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeva, M.O., Kaprelyants, A.S. (2013) Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of «non-culturable» mycobacteria, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **103**, 37–46.
 63. Orlicka, K., Barnes, E., Culver, E.L. (2013) Prevention of infection caused by immunosuppressive drugs in gastroenterology, *Ther. Adv. Chronic Dis.*, **4**, 167–185.
 64. Mohan, V.P., Scanga, C.A., Yu, K., Scott, H.M., Tanaka, K.E., Tsang, E., Tsai, M.M., Flynn, J.L., Chan, J. (2001) Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology, *Infect. Immun.*, **69**, 1847–1855.
 65. Fan, A., Jian, W., Shi, C., Ma, Y., Wang, L., Peng, D., Bai, Y., An, Q., Hao, X., Xu, Z. (2010) Production and characterization of monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* RpfB domain, *Hybridoma (Larchmt)*, **29**, 327–32.
 66. Reid, C.W., Blackburn, N.T., Legaree, B.A., Auzanneau, F.I., Clarke, A.J. (2004) Inhibition of membrane-bound lytic transglycosylase B by NAG-thiazoline, *FEBS Lett.*, **574**, 73–79.
 67. Templin, M.F., Edwards, D.H., Holtje, J.V. (1992) A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20039–20043.
 68. Atrih, A., Foster, S.J. (1999) The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **75**, 299–307.
 69. Demina, G.R., Makarov, V.A., Nikitushkin, V.D., Ryabova, O.B., Vostroknutova, G.N., Salina, E.G., Shleeva, M.O., Goncharenko, A.V., Kaprelyants, A.S. (2009) Finding of the low molecular weight inhibitors of resuscitation promoting factor enzymatic and resuscitation activity, *PLoS One.*, **4**(12), e8174.
 70. Zhang, Y. (2004) Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuber-

- culosis, *Front. Biosci.*, **9**, 1136–1156.
71. Salina, E., Ryabova, O., Kaprelyants, A., Makarov, V. (2014) New 2-thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant Mycobacterium tuberculosis cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 55–60.
72. Seidi, K., Jahanban-Esfahlan, R. (2013) A novel approach to eradicate latent TB: Based on resuscitation promoting factors, *J. Med. Hypotheses Ideas*, **7**, 69–74.
73. Gan, Y., Yao, Y., Guo, S. (2015) The dormant cells of Mycobacterium tuberculosis may be resuscitated by targeting-expression system of recombinant mycobacteriophage-Rpf: implication of shorter course of TB chemotherapy in the future, *Med. Hypotheses*, **84**, 477–80.
74. Davies, A.P., Dhillon, A.P., Young, M., Henderson, B., McHugh, T.D., Gillespie, S.H. (2008) Resuscitation-promoting factors are expressed in Mycobacterium tuberculosis-infected human tissue, *Tuberculosis*, **88**, 462–468.
75. Riaño, F., Arroyo, L., París, S., Rojas, M., Friggen, A.H., van Meijgaarden, K.E., Franken, K.L., Ottenhoff, T.H., García, L.F., Barrera, L.F. (2012) T cell responses to DosR and Rpf proteins in actively and latently infected individuals from Colombia, *Tuberculosis (Edinb.)*, **92**, 148–159.
76. Радаева Т.В., Никоненко Б.В., Капина М.А., Мищенко В.В., Апт А.С. (2006) Экспериментальные подходы к созданию вакцин против реактивации туберкулезной инфекции, *Проблемы туберкулёза и болезней лёгких*, **5**, 45–48
77. Romano, M., Aryan, E., Korf, H., Bruffaerts, N., Franken, C.L., Ottenhoff, T.H., Huygen, K. (2012) Potential of Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factors as antigens in novel tuberculosis sub-unit vaccines, *Microbes Infect.*, **14**, 86–95.
78. Yermeev, V.V., Kondratieva, T.K., Rubakova, E.I., Petrovskaya, S.N., Kazarian, K.A., Telkov, M.V., Biketov, S.F., Kaprelyants, A.S., Apt, A.S. (2003) Proteins of the Rpf family: immune cell reactivity and vaccination efficacy against tuberculosis in mice, *Infect. Immun.*, **71**, 4789–4794.
79. Kondratieva, T., Rubakova, E., Kana, B.D., Biketov, S., Potapov, V., Kaprelyants, A., Apt, A. (2011) Mycobacterium tuberculosis attenuated by multiple deletions of rpf genes effectively protects mice against TB infection, *Tuberculosis (Edinb.)*, **91**, 219–223.
80. Zvi, A., Ariel, N., Fulkerson, J., Sadoff, J.C., Shafferman, A. (2008) Whole genome identification of Mycobacterium tuberculosis vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses, *BMC Med. Genomics*, **1**, 18.
81. Mukamolova, G.V., Turapov, O., Malkin, J., Woltmann, G., Barer, M.R. (2010) Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle Bacilli in Sputum, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **181**, 174–180.
82. Kolwijck, E., Friedrich, S.O., Karinja, M.N., van Ingen, J., Warren, R.M., Diacon, A.H. (2014) Early stationary phase culture supernatant accelerates growth of sputum cultures collected after initiation of anti-tuberculosis treatment, *Clin. Microbiol. Infect.*, **20**, 418–420.
83. Freeman, R., Dunn, J., Magee, J., Barrett, A. (2002) The enhancement of isolation of mycobacteria from a rapid liquid culture system by broth culture supernate of Micrococcus luteus, *J. Med. Microbiol.*, **51**, 92–93.

84. Huang, W., Qi, Y., Diao, Y., Yang, F., Zha, X., Ren, C., Huang, D., Franken, K.L., Ottenhoff, T.H., Wu, Q., Shen, J. (2014) Use of resuscitation-promoting factor proteins improves the sensitivity of culture-based tuberculosis testing in special samples, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **189**, 612–4.