

На правах рукописи

ТРУТНЕВА КСЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО СОСТАВА
И ФАКТОРЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ
ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА 2019

Работа выполнена в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения, «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Капрельянц Арсений Сумбатович**

Официальные оппоненты:

Игнатов Сергей Георгиевич

доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», заведующий лабораторией бионанотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов

Ткаченко Александр Георгиевич

доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», профессор кафедры микробиологии и иммунологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в __ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Согласно данным ВОЗ, каждый четвертый человек на планете латентно инфицирован возбудителем туберкулёза. *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* является патогенным микроорганизмом, который может персистировать в организме человека в течение десятилетий и способен переходить под воздействием ряда факторов переходить в активную форму заболевания после длительного периода времени (Flynn and Chan, 2001).

Несмотря на многолетние исследования в этой области, мало что известно о биохимических процессах, которые могут происходить в клетках в состоянии покоя для обеспечения длительного выживания. Протеомные исследования потенциально могут принести ценную информацию об этих процессах, но из инфицированных органов людей и животных невозможно извлечь достаточно материала для такого анализа, из-за небольшого количества покоящихся клеток *Mtb*.

С целью решения этой проблемы были разработаны модели *in vitro*, которые имитируют состояние покоя. Исследования протеома патогена в известных на сегодняшний день моделях покоя проводились как с использованием 2D-электрофореза (Betts et al., 2002; Devasundaram et al., 2016; Florczyk et al., 2001; Rosenkrands et al., 2002; Starck et al., 2004), так и с помощью более современных методов протеомного исследования, таких как LC-MS/MS и SWATH (Albrethsen et al., 2013; Schubert et al., 2015). Однако все известные протеомные исследования покоящихся клеток *Mtb* были выполнены на «краткосрочных» моделях, таких как модель гипоксии Вейна (Wayne, 1994) и модель голодания Лёбеля (Loebel et al., 1933), в которых время пребывания клеток в стрессовых условиях составляет от 20 часов до 6 недель. Кроме того, покоящиеся клетки, полученные в известных моделях покоя, не имитируют истинное латентное состояние *in vivo*, при котором клетки характеризуются «некультивируемостью» (временной неспособностью расти на плотных питательных средах) и устойчивостью к антибиотикам (Chao and Rubin, 2010; Dhillon et al., 2004; Khomenko and Golyshevskaya, 1984). С целью решения этой проблемы ранее в нашей лаборатории была разработана модель перехода клеток *Mtb* и его непатогенного быстрорастущего родственника *Mycobacterium smegmatis*

(*Msm*) в состояние покоя, основанная на постепенном закислении культуральной среды. Клетки, полученные в этой модели, характеризуются утолщенной клеточной стенкой, измененной морфологией, незначительной метаболической активностью и устойчивостью к антибиотикам (Shleeva et al., 2011). Так же ранее в нашей лаборатории была разработана процедура выведения клеток из состояния покоя, или реактивации. Однако, какие метаболические процессы происходят в таких покоящихся клетках при переходе, хранении и реактивации оставалось до конца не ясно.

Целью настоящей работы является изучение особенностей белкового состава покоящихся клеток микобактерии для выявления возможных процессов, участвующих в образовании, длительном поддержании (до 1 года) в состоянии покоя и выходе из этого состояния.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ протеомных профилей активных и покоящихся клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* разного времени хранения методом двумерного электрофореза.

2. Охарактеризовать метаболические процессы, которые могут иметь место при переходе микобактерий в состояние покоя, его поддержании или выходе на основе сравнительного протеомного анализа.

3. Основываясь на данных протеомного анализа покоящихся форм обнаружить и охарактеризовать процессы, участвующие в защите и стабилизации покоящихся форм микобактерий при воздействии стрессовых факторов внешней среды.

Научная новизна. В рамках диссертационной работы впервые:

- были исследованы с помощью протеомных методов покоящиеся клетки микобактерий (*Msm* и *Mtb*), обладающие сниженной метаболической активностью после длительного периода хранения (до 1 года).
- обнаружено, что покоящиеся формы микобактерий после длительного хранения сохраняют значительное разнообразие белков, многие из которых не выявляются в протеоме активных клеток. Экспериментально подтверждено, что белки, обнаруженные в протеоме покоящихся клетках потенциально энзиматически активны. Среди обнаруженных белков в значительной степени представлены белки, участвующие в защите клетки от воздействия стрессовых факторов.

- выявлено накопление известного стрессового метаболита - свободной трегалозы, в значительных количествах в покоящихся клетках *M. smegmatis*, что делает их сходными с дрожжевыми и грибными спорами.
- установлена связь уровня трегалозы и выживаемости покоящихся клеток, а также ее важная роль в реактивации микобактерий.
- определена природа накапливаемого и секретируемого покоящиеся клетками *Msm* в значительных количествах вещества как пигмент класса порфиринов.

Научно-практическое значение. Обнаруженные в ходе работы процессы, происходящие в покоящихся клетках микобактерий важны для понимания явления латентности и реактивации туберкулеза. Белки, обнаруженные в ходе протеомного анализа покоящихся клеток *Mtb*, являются потенциальными мишенями для создания антитуберкулезных препаратов и могут быть использованы для диагностики латентного туберкулеза.

Методы исследования. Для достижения поставленных задач применялись современные методы биохимии и микробиологии. Протеомный анализ клеток микобактерий был выполнен с помощью фракционирования белков посредством двумерного электрофореза и последующим определением с помощью MALDI-TOF. Данные полученные с прибора, спектры, результаты поиска, а также результат обработки можно обнаружить по ссылке на базу данных PeptideAtlas: www.peptideatlas.org/PASS/PASS01450 (для *M. tuberculosis*); www.peptideatlas.org/PASS/PASS01462 (для *M. smegmatis*).

Степень достоверности. Научные положения и выводы диссертации Трутневой К.А. обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Покоящиеся клетки микобактерий сохраняют значительное разнообразие белков несмотря на длительное пребывание в состоянии покоя.
2. Среди сохранившихся в покоящихся клетках белков присутствуют ферменты-участвующие в центральных метаболических путях, процессах транскрипции и трансляции. Последние, очевидно,

неактивны в состоянии покоя, и необходимы в процессах последующей реактивации.

3. В покоящихся клетках микобактерий снижается представленность белков, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот, а также транспортных и биосинтетических процессах.
4. В покоящихся клетках микобактерий, по сравнению с активными клетками, увеличивается представленность белков, участвующих в защите от окислительного стресса, а также от агрегации и денатурации белков.
5. В покоящихся клетках микобактерий увеличивается представленность белков, участвующих в синтезе порфиринов и трегалозы, которые являются низкомолекулярными факторами, принимающими участие в защите и стабилизации бактериальной клетки в состоянии покоя.
6. Накопление трегалозы в покоящихся микобактериях и ее распад под действием трегалазы в первые часы реактивации впервые позволяет сделать вывод о сходстве между истинными спорами грибов и покоящимися клетками микобактерий.

Личный вклад диссертанта заключался в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на 7 научных конференциях, в том числе: На 18-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (г. Пущино, 2014); VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2015 (Барселона, Испания, 2015); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2016», (Москва, 2016); EMBO Conference Tuberculosis 2016 (Париж, Франция, 2016); Keystone Symposia Conference (Vancouver, Canada, 2017); 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); 43rd FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в российских и международных научных журналах и 8 тезисов конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов

исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка литературы и приложений (305 источников). Работа изложена на 257 страницах машинописного текста, содержит 28 рисунков и 4 таблицы. В первой главе представлен анализ литературных данных, описывающих существующие модели латентного туберкулеза и протеомные исследования этих моделей как с использованием метода двумерного электрофореза, так и с помощью более современных методов; описаны молекулярные механизмы, лежащие в основе явления латентности и персистенции, а также принципы ответа микобактерий на стресс. Во второй главе приведены сведения об используемых в работе методах, в том числе, с описанием условий, специально подобранных для данной работы. В третьей главе представлены результаты и обсуждение экспериментов по сравнительному протеомному анализу активнорастущих и покоящихся клеток микобактерий с использованием моделей покоя полученных как на возбудителя туберкулеза, так и на его непатогенном родственнике *Msm*. Также представлены результаты экспериментальной проверки некоторых процессов, обнаруженных в ходе протеомного анализа.

Список сокращений. D1 — культура покоящихся клеток, хранившаяся 4,5 месяца; D2 — культура покоящихся клеток, хранившаяся 13 месяцев. *Mtb* — *Mycobacterium tuberculosis*; *Msm* — *Mycobacterium smegmatis*. АФК — активные формы кислорода; НВЧК — наиболее вероятное число клеток. КОЕ — колониобразующие единицы. ДСРІР — дихлорфенолиндофенол.

Основные результаты и их обсуждение

1. Образование покоящихся форм и их характеристика.

Популяция покоящихся клеток *Msm* была получена путем постепенного закисления среды роста согласно опубликованному методу (Kudykina et al., 2011), а так же хранения в течение 1 месяца при комнатной температуре без перемешивания в закрытых пластиковых пробирках. Оценка жизнеспособности полученных таким образом покоящихся микобактерий производилась по величине КОЕ (колониобразующих единиц) и оставалась неизменной в течение всего исследуемого периода ($\sim 1.5\text{--}5.0 \times 10^9$ клеток в мл^{-1} для разных биологических повторностей). Определение количества жизнеспособных клеток в жидкой среде согласно методу НВЧК (англ. MPN, Most Probable Number, наиболее вероятное число клеток) (de Man, 1974)

выявило число жизнеспособных клеток *Msm*, близкое к КОЕ, что отражает почти полную культивируемость покоящихся бактерий после длительного периода хранения. Такие клетки обладали сниженной метаболической активностью согласно данным по включению радиоактивно меченого урацила, и снижением активности дыхательной цепи согласно скорости восстановления DCPIP, и поглощения кислорода. Также покоящиеся формы *Msm* в этой модели были значительно менее чувствительны к ингибированию синтеза РНК, белка и ингибированию АТФазы, что было выявлено с помощью теста на чувствительность к рифампицину, гиромоцину и бедаквилину. Такие микобактерии были использованы для анализа белкового состава и сравнения с белковым составом с активными делящимися клетками после одного месяца хранения.

В соответствии с опубликованным протоколом покоящиеся формы *Mtb*, как и покоящиеся клетки *Msm*, получали в поздней стационарной фазе путем постепенного закисления среды (Shleeва et al., 2011). Покоящиеся микобактерии хранились в пластиковых пробирках в темноте при комнатной температуре в течение 4,5 месяцев (культура «D1») и 13 месяцев (культура «D2»). Оценка жизнеспособности, хранящихся таким образом покоящихся клеток составляла около 10^4 КОЕ в мл для культуры D1 и 0 КОЕ для культуры D2. Анализ НВЧК показал, что количество жизнеспособных бактерий в данной популяции выше, чем КОЕ, что отражает развитие «некультивируемости» в покоящихся культурах *Mtb* после длительного периода хранения. Исходя из отсутствия включения радиоактивно меченого урацила и аспарагина, очевидно, транскрипционная и трансляционная активность практически отсутствует в покоящихся клетках. Покоящиеся микобактерии характеризовались значительным снижением активности восстановления DCPIP, что отражает снижение дыхательной активности (комплекс I). Дополнительной характеристикой состояния покоя может служить снижение уровня внутриклеточного цАМФ.

Ранее было обнаружено, что переход *Mtb* и *Msm* в состояние покоя и «некультивируемости» коррелирует с уменьшением концентрации цАМФ внутри клетки. (Shleeва et al., 2013, 2017). В случае с покоящимися клетками, использованными для протеомного анализа, обнаруживалась сниженная концентрация внутриклеточного цАМФ в клетках *Mtb* после 4.5 месяцев хранения, что сопровождалось развитием «некультивируемости».

Полученные таким образом покоящиеся клетки использовали для протеомного анализа.

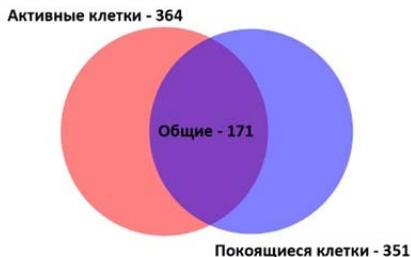
2. Сравнительный анализ протеомных профилей активных и покоящихся клеток *Msm* и *Mtb*.

2.1. Количественные аспекты

Двумерный электрофорез проводили отдельно для мембранной и цитозольной фракций активных и покоящихся клеток *Msm* и *Mtb*. Каждое пятно было вырезано из геля вручную и идентифицировалось путем анализа MALDI-TOF и поиска в базе данных MASCOT.

Для клеток *Msm* идентифицировано 588 белков с уникальным номером экспрессирующего гена и 446 белков для клеток *Mtb*. Для активнорастущих *Msm* клеток обнаружено 364 белка, и для покоящихся 351 белок в различных фракциях клеток. Было обнаружено, что представленность конкретного белка в протеомах различных типов клеток *Msm* значительно варьировала. Подобный сравнительный протеомный анализ был проведен между активными клетками *Mtb* и покоящимися формами в двух фазах хранения: 4.5 месяцев хранения (культура D1) и 13 месяцев (культура D2). Сравнение количества различных белков в разных типах клеток показывает, что в протеоме покоящихся клеток *Mtb* выявляется значительно меньше белков, чем в протеоме активных, а именно: 350 для активных клеток, 155 белков для культуры D1 и 192 для культуры D2 (Рис. 1), что очевидно связано с деградацией белков, происходящей в процессе перехода в состояние покоя и длительного пребывания в нем. Стоит отметить, что разница в представленности между белками в протеоме покоящихся клеток *Mtb* в разных временных точках не так высока. Более половины белков обнаруживается в обоих типах покоящихся клеток, что говорит об их высокой стабильности. В то же время, пул белков покоящихся клеток в точке D1 (4.5 месяца) содержит «уникальные» для своей временной точки белки, отличные от активных клеток и клеток поздней фазы покоя D2 (13 месяцев). Вероятно, это белки, которые сыграли свою роль в процессе перехода в состояние покоя, а затем подверглись деградации.

A



B

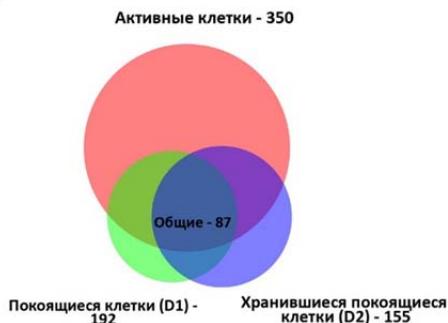


Рис. 1. Диаграммы Венна демонстрируют наличие идентичных белков, обнаруженных в протеомных профилях активных и покоящихся клеток микобактерий: *Msm* (A) и *Mtb* (B).

2.2. Анализ возможных метаболических процессов в покоящихся клетках *Msm* и *Mtb* на основе протеомных профилей

Выявление ферментов в протеомных профилях покоящихся клеток дает возможность смоделировать метаболические процессы, которые могут происходить в процессе перехода бактерий в состояние покоя, а также поддержании этого состояния или выходе из него. Так, среди ферментов основных метаболических путей были обнаружены ферменты гликолиза и ЦТК. В микобактериях превращение глюкозы в пируват осуществляется 9 ферментами, 7 из которых были обнаружены в протеомном профиле покоящихся клеток *Msm* и *Mtb*. Для отдельных ферментов была подтверждена энзиматическая активность во фракции цитоплазмы покоящихся клеток (Таб. 1).

Для клеток микобактерий, выращенных на среде Сатона, источником углерода может быть глицерин, присутствующий в среде роста даже после нескольких месяцев хранения. Уровень активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в клеточном экстракте покоящихся форм *Msm* относительно низкий, что оставляет возможность превращения глицерина в состоянии хотя и с низкой интенсивностью. С другой стороны, поскольку

среда роста не содержит глюкозы, можно предположить возможность образования глюкозы из трегалозы под действием трегалазы. Накопление трегалозы в покоящихся клетках при длительном хранении была показана экспериментально.

Исходя из того, что в протеомных профилях покоящихся клеток обнаружены различные алкогольдегидрогеназы (MSMEG_0127, MSMEG_2079, MSMEG_6242/ Rv1862, Rv0761c, Rv3045) возникло предположение, что пируват может трансформироваться в конечные продукты гликолиза, то есть в этанол или лактат, как в анаэробных бактериях. Энзиматическая активность алкогольдегидрогеназы подтверждена экспериментально на клетках *Msm* (Табл. 1).

Табл. 1. Ферментативная активность и концентрация некоторых метаболитов в активных и покоящихся клетках *M. smegmatis*.

	Активные клетки	Покоящиеся клетки
Ферментативные активности	$\mu\text{моль мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$	
Глицеролкиназа		
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	665±49	78±49
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	2550±190	93±4
Фосфоглицераткиназа	322±15	108±9
Пируваткиназа	618±46	241±17
Лактатдегидрогеназа (хинон-зависимая)	655±23	395±32
Лактатдегидрогеназа (ферментирующая)	350±20	270±30
Алкогольдегидрогеназа	0	0
Изоцитратлиаза	200±130	80±40
НАД-оксидаза	68±33	0
	221±40	8±3
Метаболиты		
НАД нмоль/мг	0.038±0.012	0.0037±0.001
НАДН нмоль/мг	0.153±0.017	0.0137±0.002
Соотношение НАД/НАДН	4.03	3.7

Однако для образования этанола из пирувата клетка должна содержать пируват-декарбоксилазу (превращение пирувата в ацетальдегид), фермент, который не аннотирован в геноме *Msm* и *Mtb*. Отсутствие активности ферментирующей лактатдегидрогеназы (в отличие от хинон-зависимой, осуществляющей обратную реакцию) делает невозможным образование лактата как продукта гликолиза покоящимися клетками. Таким образом, очевидно, содержащиеся в покоящихся клетках ферменты могут обеспечивать преобразование глюкозы до пирувата, и далее пируват может расходоваться в реакциях цикла трикарбоновых кислот.

В протеомном профиле покоящихся форм *Msm* обнаружены все 8 ферментов цикла трикарбоновых кислот, но в протеомном профиле покоящихся клеток *Mtb* лишь 6. Для адаптации к состоянию покоя в условиях анаэробнозиса у микобактерий активируется глиоксилатный шунт, что показано на модели гипоксии Вейна (Wayne and Lin, 1982). Среди ферментов, включенных в глиоксилатный шунт, в протеомных профилях была обнаружена малатсинтаза (MSMEG_3640/Rv1837), однако второй фермент этого пути — изоцитратлиаза (MSMEG_0911; MSMEG_3706/Rv1915, Rv1916) обнаружить не удалось. Измерение активности изоцитратлиазы показало отсутствие его в покоящихся клетках, в отличие от активных клеток (Табл. 1), таким образом полностью исключая возможность осуществления глиоксилатного пути в покоящихся клетках.

Из литературы известно, что в анаэробных условиях в покоящихся клетках модели Вейна микобактерии могут использовать восстановительную ветвь ЦТК от пирувата до сукцината через малат и фумарат с внеклеточным накоплением сукцината. Это позволяет окислять восстановительные эквиваленты, образовавшиеся в гликолитическом пути, и дает возможность создавать мембранный потенциал за счет секреции сукцината (Zimmermann et al., 2015). Отсутствие в протеомном профиле покоящихся форм *Mtb* изоцитратдегидрогеназы (Rv0066) и цитратсинтетазы (Rv0889) свидетельствует о том, что в покоящихся клетках в исследуемой нами модели могут происходить сходные процессы. В частности, реакции, приводящие к генерации и утилизации НАДН (в том числе в вышеописанных процессах), очевидно, происходят в покоящихся клетках, поскольку соотношение НАД/НАДН почти одинаково у активных и покоящихся клеток *Msm*, хотя индивидуальная концентрация динуклеотидов в покоящейся форме в 10 раз меньше (Табл. 1)

Несмотря на отсутствие процессов транскрипции и трансляции в покоящихся клетках, нам удалось обнаружить некоторые транскрипционные регуляторы в протеомном профиле покоящихся клеток, хотя и в малых количествах. Большинство регуляторов, обнаруженных в протеоме покоящихся форм оказалось репрессорами что отражает снижение активности метаболических процессов в целом при переходе в состояние покоя. Помимо того, обнаружены специфические регуляторы адаптации к стрессу (*MprA* Rv0981/MSMEG_5488; *phoP*/Rv0757; *Wag31*/Rv2145).

В протеоме покоящихся форм было обнаружено значительное накопление белка MSMEG_6227 (четвертый по представленности в мембранной фракции), который, согласно предварительной аннотации, является транскрипционным регулятором семейства PadR. Некоторые белки семейства PadR являются частью клеточного ответа на тепловой шок (Madoori et al., 2009; Tran et al., 2008).

Микобактерии в процессе перехода в состояние покоя экспрессируют значительное количество ферментов для инактивации АФК, которые обнаружены среди самых представленных в протеомном профиле покоящихся форм как у *Msm*, так и *Mtb*, такие, например, как супероксиддисмутазы (*sodA* Rv3846/MSMEG_6427; *sodC* Rv0432/MSMEG_0835), каталаза/пероксидаза (*katG* Rv1908/MSMEG_3461 *broC*/Rv0554).

Для поддержания окислительно-восстановительного баланса окисленных молекул микобактерии содержат аналоги глутатиона, такие как микотиол и тиоредоксин. Ферменты, участвующие в синтезе микотиола, обнаружены в протеоме покоящихся форм *Msm* (но не *Mtb*) («уникальные» для покоящихся форм MSMEG_5129, MSMEG_5261). Покоящиеся клетки *Mtb* обнаруживают в протеоме другой функциональный эквивалент глутатиона — тиоредоксин, а именно тиоредоксин С (Rv3914), а также тиоредоксин-редуктазу (Rv3913) для восстановления тиоредоксина.

В протеомном профиле покоящихся клеток *Msm* обнаружены ферменты биосинтеза порфирина: порфобилиноген деаминаза (MSMEG_0953), дегидрогеназа дельта-аминолевулиновой кислоты (MSMEG_0956), уропорфириноген декарбоксилаза (MSMEG_2780), которые не обнаруживаются в протеомном профиле активных клеток, что свидетельствует о повышении интенсивности синтеза порфирина при переходе в состояние покоя. И действительно, это предположение подтверждается данными о накоплении флуоресцирующего пигмента

внутри- и внеклеточно в покоящихся клетках *Msm*. ¹H-ЯМР и спектральный анализ позволили отнести обнаруженный пигмент к классу порфиринов. Порфирины и их комплексы с металлами проявляют свойства антиоксидантов, защищая бактерии (Patel and Day, 1999), животные клетки (Antonova et al., 2010) и митохондрии (Castello et al., 2008) от активных форм кислорода и нуклеофильных соединений (Fuhrhop, 1974). Вполне вероятно, что порфирины могут играть важную роль в обеспечении защиты покоящихся форм от неблагоприятных условий среды.

Для защиты белков от различных стрессовых воздействий и репарации у микобактерий синтезируются шапероны, которые обнаруживаются в протеоме обоих типов клеток (активных и покоящихся) в значительных количествах и большом разнообразии. Неудивительно, что в протеомном профиле покоящихся форм *Mtb* и *Msm* обнаружен шаперон, гомолог альфа-кристаллина (hspX/Rv2031/MSMEG_3932), входящий в Dos регулон, и который стабильно обнаруживается при любом, в том числе неспецифическом стрессе, и был неоднократно обнаружен в протеомах других моделей покоящихся форм микобактерий (Mishra and Sarkar, 2015; Rosenkrands et al., 2002; Starck et al., 2004). Среди обнаруженных в покоящихся клетках *Mtb* шаперонов имеются следующие представители GroL/MSMEG_0880, dnaJ1/Rv0352; htpG/Rv2299, groEL2/Rv0440, dnaK/MSMEG_0709/Rv0350; groES/Rv3418; groEL1/Rv3417, триггер фактор MSMEG_4674/Rv2462; HtpG/Rv2299c, hspX/Rv2031/MSMEG_3932; ClpB/MSMEG_0732/Rv0384c.

Для стабилизации ДНК и предотвращения ее повреждений в условиях стресса у микобактерий синтезируется ДНК-связывающий гистоноподобный белок (hupB/Rv2986), обнаруженный в протеомном профиле покоящихся форм *Mtb*. Гистон-подобные белки имеют крайне высокое сходство с гистонами эукариот и оказывают большое влияние на компактизацию и топологию ДНК (Anuchin et al., 2010; Colangeli et al., 2009; Gupta et al., 2014). В мембранной фракции покоящихся клеток *Mtb* самым представленным белком является Rv0341 (iniB) с неизвестной функцией, имеющий ДНК связывающий домен согласно базе данных Uniprot, и, возможно, выполняющий защитную функцию в отношении ДНК (Shleeva et al., 2018).

В процессе перехода в состояние покоя в клетках останавливаются или сильно замедляются процессы биосинтеза, таким образом, неудивительно, что протеом покоящихся клеток *Mtb* «беднее» ферментами биосинтеза по

сравнению с протеомом активнорастущей культуры. Протеом покоящихся клеток *Mtb* и *Msm* характеризуется отсутствием многих ферментов, ответственных за биосинтез важных биомолекул которые обнаруживаются в протеоме активных клеток: пиримидинов, пуринов, пиридоксина, тимидилатов, гистидина, кобаламина и пантотената.

Протеом покоящихся форм содержит множество ферментов, которые участвуют в деградации основных клеточных компонентов, таких как липиды, жирные кислоты, белки, пептиды и аминокислоты. С одной стороны, обнаруженные ферменты деградации могут расщеплять поврежденные молекулы в отсутствие процессов синтеза *de novo*, с другой стороны, продукты расщепления могут использоваться для поддержания жизнедеятельности клетки при длительном хранении, которое можно назвать «катаболическим выживанием».

3. Накопление свободной трегалозы в процессе перехода в состояние покоя.

В протеомном профиле покоящихся клеток *Msm* был обнаружен «уникальный» фермент синтеза трегалозы — трегалозосинтетаза (TreS/MSMEG_6514). Этот фермент участвует в пути синтеза трегалозы из мальтозы. Исходя из этого возникло предположение, что в покоящемся состоянии увеличивается содержание трегалозы по сравнению с активными клетками, что было подтверждено дальнейшими исследованиями. Мы проанализировали компоненты водно-метанольного экстракта покоящихся клеток *Msm* с помощью ¹H- и ¹³C-ЯМР, что позволило идентифицировать основной компонент цитоплазмы покоящихся клеток как трегалозу. Процентная доля трегалозы оценивается примерно в 64% от общего количества органических растворимых веществ цитоплазмы для покоящихся клеток, в отличие от активных клеток, где ее обнаруживается всего 15%.

3.1. Зависимость выживаемости клеток от уровня внутриклеточной трегалозы

Чтобы установить, насколько важна накопленная трегалоза в поддержании жизнеспособности покоящихся клеток *Msm*, была оценена жизнеспособность клеток с различными уровнями содержания внутриклеточной трегалозы. Для того чтобы варьировать уровень трегалозы был использован штамм *Msm* с гиперэкспрессией трегалозы

MSMEG_4535, фермента гидролизующего трегалозу. В клетках этого штамма уровень активности трегалазы был увеличен в 10 раз по сравнению с контрольным штаммом, однако уровень трегалозы в активнорастущих бактериях был снижен незначительно.

При росте на плотной и жидкой питательной среде штамм pES_MSMEG_4535 вел себя сходным образом по сравнению с контрольным штаммом в фазе активного роста и был способен образовывать покоящиеся клетки. Однако внутриклеточная концентрация трегалозы в клетках штамма с гиперэкспрессией трегалазы постепенно снижалась в течение периода хранения клеток и через 75 дней была крайне низкой (Рис. 2). Оценка жизнеспособности покоящихся клеток методом НВЧК показала прямую корреляцию между содержанием трегалозы и жизнеспособностью клеток (Рис. 2). Этот эксперимент наглядно демонстрирует связь между содержанием трегалозы и поддержанием жизнеспособности покоящихся клеток в течение длительного времени без размножения.

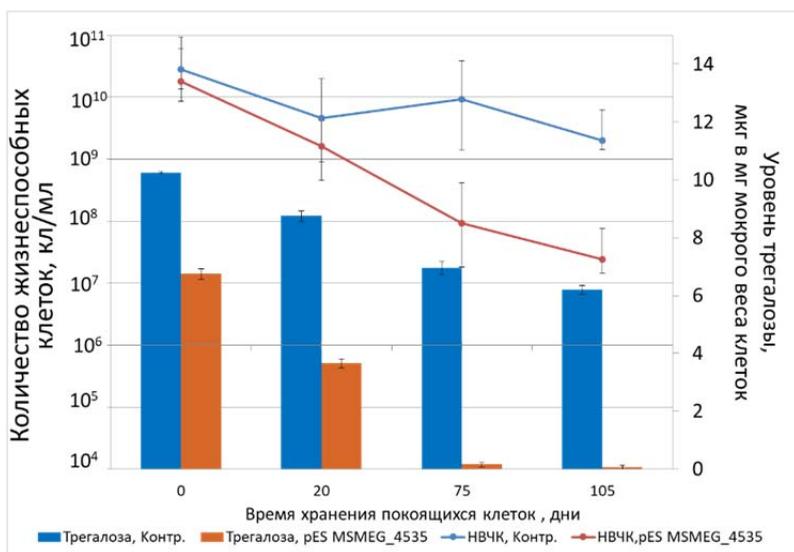


Рис. 2. Зависимость жизнеспособности покоящихся клеток *M. smegmatis* от внутриклеточного содержания трегалозы. Покоящиеся клетки *M. smegmatis* содержали пустую плазмиду pES (синий цвет) и клетки с гиперэкспрессией трегалазы MSMEG_4535 (оранжевый цвет). Оценка жизнеспособности клеток проводилась методом НВЧК (линии), а уровня

трегалазы (столбцы) с помощью ВЭЖХ. Точка ноль соответствует времени переноса 13-15-дневных клеток в поздней стационарной фазе в пластиковые закрытые пробирки. Эксперимент проводили в трех биологических повторностях.

3.2 Изменение уровня трегалазы за счет активности трегалазы в процессе реактивации покоящихся клеток.

Покоящиеся клетки *M. smegmatis* способны к самореактивации, то есть возобновлению роста и деления при попадании в свежую среду культивирования после некоторого периода «оживления», которое предшествует делению клеток (Shleeва et al., 2013). Мы обнаружили, что содержание внутриклеточной трегалазы уменьшается на начальном этапе реактивации (до 5 ч) (Рис. 4) - до возобновления метаболической активности (8-12ч) (Рис. 3), регистрируемой с помощью радиоактивно-меченного урацила. Количество трегалазы продолжало уменьшаться до тех пор, пока не началось деление клеток (измеренное с помощью КОЕ) приблизительно через сутки после начала реактивации.

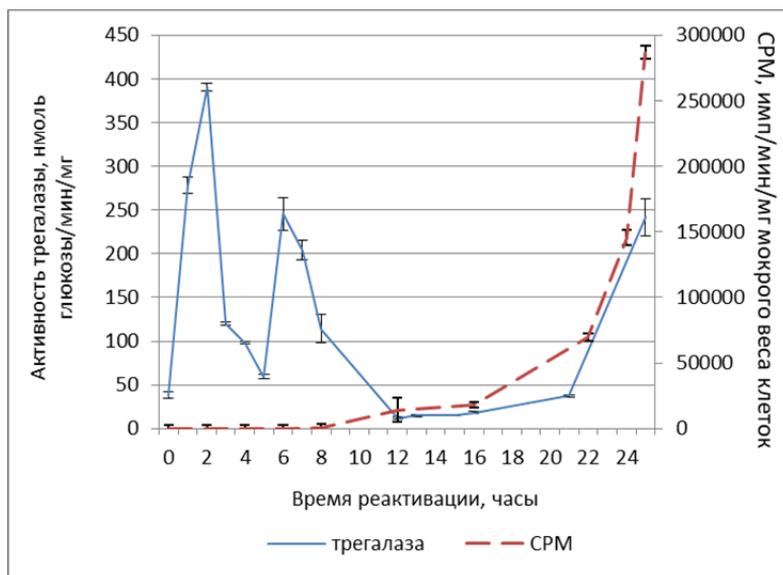


Рис. 3. Изменение активности трегалазы (сплошная линия) и включения НЗ-урацила (пунктирная линия) в клетках *M. smegmatis* в процессе реактивации. Бары представляют собой стандартную погрешность.

После начала деления уровень трегалозы становится близким к уровню активных клеток в логарифмической фазе роста (0.2-0.5 мкг/мг влажного веса клеток после 48 ч культивирования). Снижение количества трегалозы связано с ее гидролизом, поскольку на начальной стадии реактивации происходит увеличение концентрации глюкозы (Рис. 4). Уровень глюкозы снижался после 5 ч. с момента начала реактивации до тех пор, пока не достигал уровня активных клеток в логарифмической фазе роста (приблизительно 0.2 мкг/мг мокрого веса клеток). Очевидно, что снижение содержания глюкозы связано с использованием ее в начинающих работать метаболических путях.

Поскольку гидролиз трегалозы контролируется трегалазой, мы проверили активность трегалазы на стадии реактивации. Через 2 часа после начала реактивации было обнаружено значительное увеличение активности трегалазы (Рис. 3), которое имело временный характер и сопровождалось резким увеличением уровня глюкозы, а затем быстрым снижением содержания трегалозы (Рис. 4). Второй пик активности трегалазы был обнаружен через 5-7 ч после начала реактивации и третий через 24 часа, когда началось размножение клеток. Эта активность поддерживалась на постоянном уровне во время всего периода логарифмического роста.

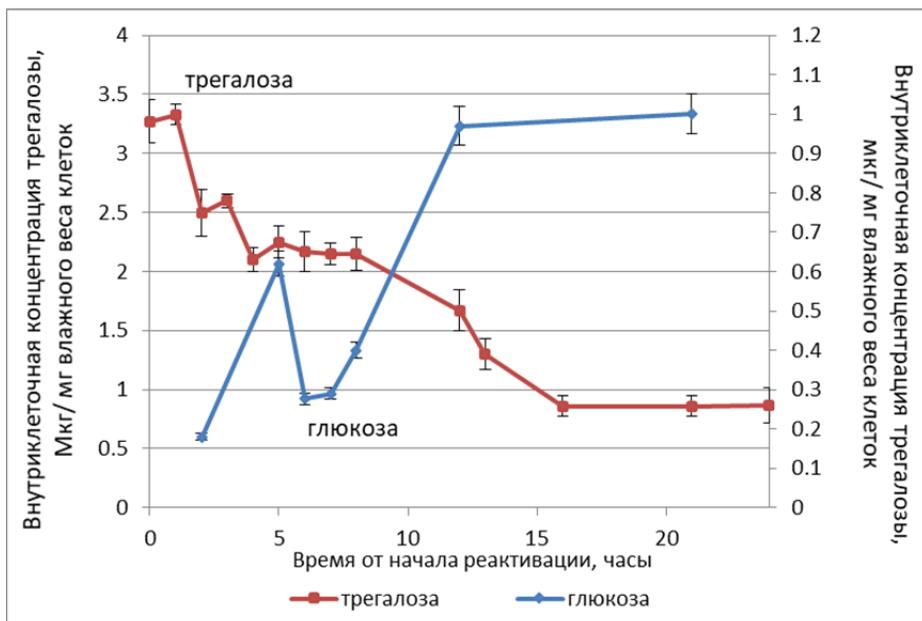


Рис. 4. Изменение уровня внутриклеточной трегалозы (красная линия) и глюкозы (синяя линия) в клетках *M. smegmatis* в процессе реактивации. Бары представляют собой стандартную погрешность.

Таким образом, в процессе реактивации покоящихся форм *Msm* мы наблюдаем гидролиз трегалозы под действием трегалозы с последующим образованием глюкозы, которая затем может использоваться в качестве источника углерода и энергии в биосинтетических процессах. Сходный механизм был ранее описан при прорастании дрожжевых спор.

Настоящее исследование впервые демонстрирует наличие стабильных белков в покоящихся микобактериях после длительного пребывания в состоянии покоя и сохранение ферментативной активности некоторых ферментов. Очевидно, эта стабильность обеспечивается белками и ферментами систем защиты от стрессовых факторов, хорошо представленными в протеоме покоящихся клеток, а также низкомолекулярным стабилизатором трегалозой. Обнаруженный в покоящихся клетках пигмент порфириновой структуры также может выполнять защитную функцию.

Мы предполагаем, что все белки, обнаруженные в покоящихся клетках, можно разделить на три группы: 1) белки, которые экспрессируются при переходе от активного состояния в состояние покоя; 2) белки, которые являются «запасенными» и хранятся в покоящихся клетках для дальнейшей реактивации клеток в случае наступления благоприятных условий; 3) белки, которые являются функциональными и могут играть роль в поддержании клеточного метаболизма на уровне достаточном для выживания.

В покоящихся клетках *Msm* при сравнении с активнорастущими клетками обнаружено значительное накопление трегалозы. Очевидно, что трегалоза стабилизирует покоящиеся клетки, это доказывает прямая корреляция между содержанием трегалозы и жизнеспособностью клеток. В процессе реактивации происходит уменьшение содержания трегалозы, что связано с активацией фермента трегалазы.

Активация трегалазы при реактивации покоящихся клеток *Msm* сопровождается уменьшением содержания трегалозы и увеличением концентрации глюкозы, что указывает на использование вновь образованной глюкозы в начальный период реактивации, когда метаболизм еще не функционирует в полном объеме. Обнаруженные процессы, связанные с метаболизмом трегалозы, позволяют впервые провести параллель между покоящимися формами микобактерий и истинными спорами грибов и дрожжей.

Выводы:

1. Покоящиеся клетки *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* сохраняют значительное количество белков в условиях длительного (до 13 месяцев года для *M. tuberculosis*) пребывания в состоянии покоя при сниженной метаболической активности, отсутствии деления и синтеза белков *de novo*.
2. В покоящихся клетках микобактерий снижается количество белков участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот, других важных биомолекул (витаминов, кофакторов ферментов), а также транспортных белков.
3. Среди сохранившихся в покоящихся клетках белках присутствуют потенциально активные ферменты центральных метаболических путей, что может обеспечивать процессы необходимые для поддержания длительного выживания или реактивации из состояния покоя.
4. В протеомных профилях покоящихся клеток микобактерий значительно увеличивается представленность белков, участвующих в защите от окислительного стресса, агрегации белков и стабилизации нуклеиновых кислот.
5. В покоящихся клетках *M. smegmatis* обнаружены в значительных количествах стабилизирующие молекулы: порфирины и трегалоза, а также ферменты их метаболизма.
6. Накопление трегалозы, определяющее жизнеспособность покоящихся клеток, и ее распад в первые часы реактивации таких клеток позволяет установить сходство между покоящимися клетками микобактерий и истинными спорами грибов и дрожжей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах

1. Trutneva K., Shleeva M., Nikitushkin V., Demina G., Kaprelyants A. Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9:2083.

2. Shleeva M. Trutneva K., Demina G., Zinin A., Sorokoumova G., Laptinskaya P., Shumkova E., Kaprelyants A. Free trehalose accumulation in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and its breakdown in early resuscitation phase. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 524.

3. Nikitushkin V., Shleeva M., Zinin A., Trutneva K., Ostrovsky D., Kaprelyants A. The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin. *FEMS Microbiology Letters*. 2016, 363(19) pii: fnw206.

4. Никитушкин В.Д. Зинин А.И. Капрельянц А.С. Островский Д.Н. Трутнева К.А. Шлеева М.О. Пигмент покоящихся микобактерий определен как порфилин. *Межрегиональный сборник научных работ, Воронеж 2014*. вып. 16, стр. 4-9.

5. Островский Д.Н., Никитушкин В.Д., Трутнева К.А., Зинин А.И., Шлеева М.О., Капрельянц А.С. Избирательная экстракция липидов с поверхности бактерий с целью локализации структурных перемен при переходе их в состояние покоя. *Межрегиональный сборник научных работ, Воронеж, 2016*, вып. 18, стр. 4-12.

Материалы конференций

1. Трутнева К.А., Шлеева М.О., Демина Г.Р., Капрельянц А.С. Особенности белкового состава покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis*. Биология наука 21 века, 18-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Россия, г. Пущино, 21 – 25 апреля 2014 г. 165 стр.

2. Trutneva K., Shleeva M., Demina G., Shumkov M., Kaprelyants A. PadR-like Protein (MSMEG_6227) is a major protein in *Mycobacterium smegmatis* dormant cells obtained after adaptation to gradual acidification. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015. Barcelona, Spain, 28-30 October 2015. p. 407

3. Трутнева К.А., Шлеева М.О., Демина Г.Р., Капрельянц А.С. Сравнительный протеомный анализ активных и покоящихся клеток *Mycobacterium smegmatis*. Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2016», 11-15 апреля 2016.

4. M. Shleeva, G. Demina, K. Trutneva, D. Ostrovsky, A. Kaprelyants. Free trehalose is accumulated in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and is required for their early resuscitation phase. EMBO Conference Tuberculosis 2016. Paris, France, 23 September, 2016. p. 253

5. Trutneva K., Shleeva M., Demina G., Kaprelyants A. Comparative proteomic analysis of active and dormant mycobacterial cells. Keystone Symposia Conference. New Developments in Our Basic Understanding of Tuberculosis. Vancouver, Canada. January 14 - January 18, 2017.

6. Trutneva K., Shleeva M., Demina G., Kaprelyants A. Survival and reactivation of dormant "nonculturable" mycobacteria depends on trehalose content and trehalase activity. 42nd FEBS Congress, From Molecules to Cells and Back. Jerusalem, Israel, September 10-14, 2017. Volume 284, p. 374-375.

7. Shleeva M., Trutneva K., Shumkov M., Demina G., Kaprelyants A. Major protein Rv0341 in the membrane of dormant *Mycobacterium tuberculosis* binds DNA and reduces the rate of RNA synthesis. FEBS Open Bio, 8: 18-039. 2018

8. Trutneva, K. A. Shleeva, M. Demina, G. Kaprelyants, A. Proteomic features of dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells with ovoid morphology. FEBS Open Bio, 8: 18-044. 2018