

На правах рукописи

Салина Елена Геннадьевна

ТРАНСКРИПТОМИКА *Mycobacterium tuberculosis*
В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ И ПОДХОДЫ
К ИНАКТИВАЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Капельяниц Арсений Сумбатович, доктор биологических наук, профессор, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов, заведующий лабораторией.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Кочетков Сергей Николаевич, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений, заведующий лабораторией.

Кубарева Елена Александровна, доктор химических наук, профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», отдел химии нуклеиновых кислот, главный научный сотрудник.

Романова Юлия Михайловна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел генетики и молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита состоится « 4 » июня 2020 г. в 14 час на заседании 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 сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан « 4 » марта 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А. Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Туберкулез (ТБ) ежегодно уносит около двух миллионов человеческих жизней на планете, кроме того, каждый год регистрируется свыше восьми миллионов новых случаев инфицирования туберкулезной инфекцией. Еще более высоким уровнем распространения характеризуется латентная форма ТБ: по данным ВОЗ, около 25% населения Земли латентно инфицированы возбудителем туберкулеза – бактерией *Mycobacterium tuberculosis* (WHO Global tuberculosis report, 2019), живя с постоянным риском перехода латентной формы в активную. Активация латентной инфекции происходит в течение жизни примерно у 5% инфицированных, и связана, по всей вероятности, с возрастными и экзогенными нарушениями в работе иммунной системы. Следует отметить значительный успех в разработке новых противотуберкулезных лекарственных препаратов с оригинальными мишенями: бедаквилина (Сиртуро®, "Янссен Терапьютикс", Титусвилл, Нью-Джерси, США), специфического ингибитора АТФ-синтазы микобактерий (Koul *et al.*, 2007), деламанида (Дельтиба®, "Оцука фармасьютикалз", Токио, Япония), ингибитора биосинтеза метокси-миколовых и кето-миколовых кислот (Matsumoto *et al.*, 2006), уже одобренных к применению в ряде стран, а также макозинона (PBTZ169), подавляющего биосинтез клеточной стенки микобактерий (Макаров *et al.*, 2009, Макаров *et al.*, 2014) путем ингибирования оригинальной мишени декапренилфосфорил- β -D-рибоза-2'-эпимеразы (DprE1), и находящегося на второй фазе клинических испытаний. Однако препараты, высокоактивные в отношении вегетативных клеток *M. tuberculosis*, оказались неэффективными в отношении латентной инфекции.

Поэтому изучение форм и механизмов персистенции *M. tuberculosis* и активации латентной инфекции, а также поиск лекарственных средств, эффективных против латентной формы туберкулеза, являются одним из важнейших научных направлений. К сожалению, знания как о причинах активации латентного ТБ, так и о природе латентного состояния все еще весьма ограничены. Согласно распространенной точке зрения, латентность *M. tuberculosis* связана со свойством возбудителя образовывать в организме хозяина покоящиеся формы, характеризующиеся крайне медленным ростом внутри хозяина, или же вовсе неспособные к росту и делению (Gangadharam *et al.*, 1995; Grange *et al.*, 1992). Покоящиеся формы *M. tuberculosis*,

обладающие рядом ультраструктурных и физиологических особенностей, а также свойством «некультивируемости», то есть обратимой потерей способности образовывать колонии на неселективных плотных средах, были обнаружены экспериментально как *in vitro*, так и *in vivo* (Chao & Rubin, 2010, Dhillon *et al.*, 2004, Khomenko&Golyshevskaya, 1984). Для перехода в состояние активного роста таким бактериям требуется специальная процедура реактивации (Chao & Rubin, 2010, Young *et al.*, 2005).

По определению, покоящиеся формы (ПФ) характеризуются метаболически инертным состоянием, которое поддерживается клеткой в течение длительного времени, и отсутствием, в том числе, транскрипционной активности. Однако в ряде моделей *in vitro*, опубликованных к настоящему времени, сообщается о значительной метаболической активности покоящихся клеток и наличии высокой транскрипционной активности, а также о сохранении способности клеток к росту и делению, что вызывает сомнения в адекватности этих моделей состоянию покоя *M. tuberculosis in vivo* (Wayne & Hayes, 1996, Betts *et al.*, 2002, Deb *et al.*, 2009, Sala *et al.*, 2010). В этой связи, для понимания феномена покоя у *M. tuberculosis* и латентного состояния ТБ инфекции, ключевым является изучение транскриптома покоящихся клеток *M. tuberculosis*, которые имеют существенно сниженную метаболическую активность и обладают свойством «некультивируемости». Отметим, что в последние годы появились сообщения о наличии транскриптов в таких покоящихся формах, как эндоспоры бацилл и микроспоры миксобактерий (Segev *et al.*, 2012, Munoz-Dorado *et al.*, 2019). Для покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis* такой информации нет. Исследование транскриптома покоящихся форм *M. tuberculosis* и транскрипционной активности клеток, переходящих в состояние покоя и «некультивируемости» и выходящих из него, позволит обнаружить метаболические реакции, ответственные за эти процессы. Эта новая информация поможет выявить потенциальные молекулярные мишени лекарственных препаратов, направленных против латентной инфекции, и будет способствовать формулированию стратегии поиска новых высокоэффективных «антилатентных» соединений.

Вышеизложенное определяет актуальность проблемы исследования механизмов латентной инфекции для дальнейшего развития представлений о покоящемся состоянии и персистенции патогенных бактерий, а также для выбора стратегии поиска лекарственных средств для борьбы с латентным ТБ и другими персистирующими инфекциями.

Цель и основные задачи исследования

Целью настоящей работы было изучить и выявить особенности транскриптомов клеток *M. tuberculosis* в процессе их перехода в состояние покоя и выхода из него, а также определить стратегию поиска соединений, эффективных в отношении покоящихся форм возбудителя ТБ.

Для достижения цели работы были сформулированы следующие задачи:

1. Получить *in vitro* покоящиеся «некультивируемые» формы *M. tuberculosis*, адекватно отражающие состояние латентной ТБ инфекции в живых организмах, для проведения полного транскриптомного анализа.
2. Изучить транскриптом покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, определить индивидуальные транскрипты, характерные для состояния покоя.
3. Охарактеризовать транскрипционные профили клеток *M. tuberculosis* в процессе их перехода в состояние покоя и выхода из него, и определить их основные дискриминирующие характеристики.
4. Предложить подходы к поиску лекарственных препаратов, активных в отношении латентной инфекции *M. tuberculosis*.
5. Исследовать новые соединения, активные против покоящихся клеток *M. tuberculosis*, и охарактеризовать механизм их действия.

Научная новизна

– В настоящем исследовании впервые проведен полнотранскриптомный анализ покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis* H37Rv и клеток на стадиях перехода в состояние покоя и реверсии к активному росту. Выявлены особенности транскриптомов покоя и реактивации.

– Обнаружено, что состояние покоя *M. tuberculosis* характеризуется глобальным снижением количества мРНК в клетке при стабильном сохранении в отсутствие синтеза *de novo* немногочисленной группы стабильных транскриптов, которая включает белок-кодирующие транскрипты, функциональные, по-видимому, при реактивации покоящихся клеток, и транскрипты малых «некодирующих» РНК с возможной функцией замедления клеточного метаболизма. Для транскриптов покоящихся клеток предложен термин «запасенные транскрипты». Значительную их долю составляют малые некодирующие РНК.

– Впервые показано, что процесс реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis* на ранней стадии характеризуется быстрой активацией транскрипции ряда генов («транскрипционным взрывом»), среди которых существенную долю составляют гены, кодирующие ферменты биосинтеза

жирных и миколовых кислот и ферменты репарации поврежденных структур клеток микобактерий

– Предложена новая стратегия уничтожения персистирующих клеток микобактерий, заключающаяся в неселективном ингибировании множественных мишеней антибактериальных агентов и/или их необратимую химическую модификацию с образованием токсичных для бактериальной клетки продуктов

– Найдены и охарактеризованы два класса оригинальных химических соединений: тиенопиримидины и гидроксотиопиридинтионы, производные которых обладают существенной бактерицидной активностью, в том числе, в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*, и механизм действия которых соответствует сформулированным выше критериям. Производные класса гидроксопиридинтионов обеспечивают аккумуляцию в микобактериальной клетке ионов меди, обладающих антимикробными свойствами. Производные класса тиенопиримидинов являются пролекарствами и метаболизируются в клетке микобактерий с образованием оксида азота NO и высокорекреационных –SH групп, взаимодействующих с широким спектром ферментов патогена.

Теоретическая и практическая ценность

Получена новая информация о механизмах перехода клеток *M. tuberculosis* в покоящееся состояние *in vitro*, имитирующее латентную форму ТБ инфекции. Полный транскриптомный анализ клеток, переходящих, находящихся в состоянии покоя и выходящих из него, выявил особенности, характерные для каждого из этих состояний микобактерий и свойственные, по-видимому, покоящимся формам других неспорообразующих патогенных бактерий. На основании полученной информации сформулировано положение о необходимости запасаения стабильных транскриптов в покоящихся клетках бактерий, высказано предположение об их роли при реактивации покоящихся клеток для их реверсии к росту. На ранней стадии реактивации обнаружена быстрая инициация транскрипции генов, для которой предложен термин «транскрипционный взрыв». Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания механизмов выживания клеток патогенных микроорганизмов в стрессовых и неростовых условиях.

Предложена новая стратегия поиска лекарственных соединений, активных в отношении латентной ТБ инфекции, основанная на их способности к энергонезависимому транспорту в покоящуюся клетку и неселективному ингибированию множественных мишеней патогена, приводящему к высокой

биоцидной активности. Эффективность предложенного подхода подтверждена обнаружением новых химических соединений, проявляющих высокую бактерицидную активность в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis* и обладающих предсказанным механизмом действия. Направленный скрининг соединений с вышеперечисленными свойствами является основой для разработки эффективных лекарственных средств против латентного ТБ и других персистирующих инфекций.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Покоящиеся «некультивируемые» клетки *M. tuberculosis* характеризуются глобальным снижением количества транскриптов. В покоящихся клетках в отсутствие синтеза *de novo* сохраняются немногочисленные стабильные транскрипты, включая как транскрипты белок-кодирующих генов, так и малые некодирующие РНК, которые можно охарактеризовать как «запасенные транскрипты», используемые клетками при их реактивации.

2. Процесс реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis* на ранней стадии выхода из состояния покоя характеризуется быстрой активацией транскрипции («транскрипционным взрывом») генов, кодирующих ферменты биосинтеза жирных и миколовых кислот и системы репарации клетки. На поздних этапах реактивации происходит активация транскрипции генов, кодирующих ферменты центральных метаболических путей.

3. Поскольку покоящиеся клетки бактерий характеризуются инертностью метаболизма и неактивностью молекулярных мишеней антибиотиков, антибактериальные препараты, эффективные против покоящихся форм, должны приводить к неселективному ингибированию ферментов и других биомолекул.

4. Механизм действия производных класса гидроксопиридинтионов, обладающих значительным бактерицидным эффектом в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*, основан на их способности аккумулировать и транспортировать в микробную клетку ионы меди, антибактериальные свойства которых реализуются за счет неселективной модификации биомолекул патогена.

5. Производные класса тиенопиримидинов, также обладающие бактерицидной активностью в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*, метаболизируются в клетке патогена с образованием оксида азота NO и реактивных –SH групп, неспецифически связывающихся с широким спектром биомолекул.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были доложены на международных конференциях: Tuberculosis: Biology, Pathogenesis, Intervention Strategies (Париж, Франция, 2012), Первая российская конференция по медицинской химии (Москва, 2013), 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Иокогама, Япония, 2013), Keystone Symposium: Novel Therapeutic Approaches to Tuberculosis (Кистоун, США, 2014), Towards Therapies of the Future (Москва, 2014), 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Амстердам, Нидерланды, 2016), Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей (Москва, 2018), 20th International Research Conference on Tuberculosis (Лондон, Великобритания, 2018).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 39 печатных работ, среди которых 18 статей в международных и российских научных рецензируемых журналах, индексированных Web of Science, и 21 тезис докладов международных и российских конференций и статей в сборниках.

Список принятых сокращений

ТБ – туберкулез, ПФ – покоящиеся формы, МИК – минимальная ингибирующая концентрация, КОЕ – колониеобразующие единицы, НВЧ – метод наиболее вероятных чисел, РИФ – рифампицин, ИН – изониазид, ЦФ – ципрофлоксацин, НТО – нетранслируемые области, НРТ – гидроксипиридинтионы, ТР – тиенопиримидины, ДТТ – дитиотреитол, СССР – хлорфенилгидразон карбонилцианид.

Структура и объем работы

Диссертация содержит разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов собственных исследований и их обсуждение, заключение и список цитируемой литературы, включающий 327 ссылок, а также 5 приложений. Диссертация изложена на 400 страницах машинописного текста и содержит 16 таблиц и 52 рисунка.

Методы исследования

Объект исследования и условия культивирования. Бактерии *M. tuberculosis* H37Rv культивировали в синтетической среде Сотона с внесением ростовой добавки ADC (HiMedia, Индия) и 0,05% твина-80 при 37 °С с перемешиванием (200 об/мин). Для получения покоящихся

«некультивируемых» клеток бактерии *M. tuberculosis* инкубировали в среде того же состава, но дефицитной по ионам калия.

Электронно-микроскопические исследования проводили на электронном микроскопе JEM–100B (Jeol, Япония). Ультратонкие срезы клеток получали на ультратоме LKB3 (LKB, Швеция) (толщина срезов 200–300 Å) и окрашивали цитратом свинца методом Рейнольдса (Reynolds, 1963).

Включение ³H-урацила в микобактериальные клетки (1 μCi) проводили при 37 °C в течение 20 ч, используя культуры с клеточной плотностью $2 \cdot 10^7$ кл/мл. Количество импульсов регистрировали на счетчике (Beckman Instruments, Inc).

Выделение РНК и полный транскриптомный анализ методом RNA-seq. Культуру *M. tuberculosis* H37Rv охлаждали во льду, центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. Клетки разрушали с кремний-циркониевыми бусами на дезинтеграторе Bead Beater (BioSpec, США). Тотальную РНК выделяли путем фенол-хлороформенной экстракции (Rustad *et al.*, 2009). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой Turbo DNase (Life Technologies, США) для удаления следовых количеств геномной ДНК, затем проводили очистку набором RNeasy mini kit (Qiagen, Netherlands). Для удаления рибосомальных РНК использовали набор Ribo-Zero Epidemiology (Illumina, США). Построение библиотек кДНК проводили с использованием набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB, США). Секвенирование осуществляли на секвенаторе HiSeq 2500 (Illumina, США).

Обработка данных транскриптомного анализа. Полученные при секвенировании кДНК прочтения картировали на геном *M. tuberculosis* H37Rv с использованием программного обеспечения Bowtie2 (Langmead&Salzberg, 2012). Транскрипционные профили визуализировали при помощи геномного браузера Artemis (Carver *et al.*, 2012). Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с использованием пакета программ edgeR (Robinson *et al.*, 2010), распределение генов *M. tuberculosis* по функциональным категориям проводили, основываясь на базах данных TubercuList и PATRIC (Lew *et al.*, 2011, Wattam *et al.*, 2014). Уровень статистической значимости полученных результатов составлял не менее 95%.

Определение минимальной ингибирующей концентрации соединений проводили по стандартному протоколу (Clinical and Laboratory Standards, 2007), используя в качестве тест-объекта клетки *M. tuberculosis* H37Rv логарифмической фазы роста ($1 \cdot 10^5$ кл / мл).

Оценка бактерицидного действия соединений. В культуры *M. tuberculosis* различных стадий развития вносили изучаемые соединения в широком интервале концентраций, культуры инкубировали 7 суток при 37 °С и перемешивании 200 об/мин, после чего клетки отмывали и определяли их жизнеспособность методом предельных разведений при их инкубации в течение 30 суток при 37 °С в стандартной среде Сотона с ростовой добавкой ADC. Наиболее вероятное число (НВЧ) жизнеспособных клеток рассчитывали с использованием статистических таблиц (de Man, 1975).

Содержание меди в клетках *M. tuberculosis* определяли при помощи масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) на приборе Auroga M90 (Bruker, USA). Для регистрации и процессинга данных использовали программное обеспечение Quantum (Bruker, v3.1b1433).

Детекцию комплексов гидроксопиридинтионов с ионами Cu^{2+} в клетках микобактерий проводили при помощи ионизационной масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI^+ -MS).

Выделение и характеристика мутанта *M. tuberculosis*, резистентного к соединению TP053. Устойчивые мутанты получали путем посева $\sim 10^{10}$ клеток поздней экспоненциальной фазы роста культуры дикого типа на плотную питательную среду Миддлбура 7H11, содержащую соединение TP053 в концентрациях, соответствующих 5– 20 МИК. Посевы инкубировали при 37° С в течение 4 недель и собирали колонии выросших мутантов. Геномную ДНК устойчивого мутанта *M. tuberculosis* и штамма дикого типа выделяли и секвенировали по технологии Illumina HiSeq2000.

Определение оксида азота NO. Раствор 200 мкМ соединения TP053 в присутствии 1 мг/мл рекомбинантного белка Rv2466с инкубировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.5 в присутствии 1 мМ дитиотреитола. Восстановление TP053 регистрировали по изменению величины оптического поглощения реакционной смеси при длине волны 412 нм. Уровень продукции NO пропорционален уровню образующегося в реакции Грисса нитрита (Verdon *et al.*, 1995), количество которого определяли по величине оптического поглощения при 540 нм с использованием соответствующей стандартной калибровочной кривой. В качестве положительного контроля использовали культуру *M. bovis* BCG, обработанную донором NO – претоманидом PA-824 (32 мкг/мл), в качестве отрицательного – культуру, обработанную изониазидом (32 мкг/мл). Уровень продукции образующегося оксида азота в культуральной жидкости *M. bovis* BCG определяли, как описано выше. Все измерения проводили в трех повторах.

Метаболическая трансформация соединения TP053 в клетках *M. tuberculosis*. Клетки *M. tuberculosis* H37Rv в культуре середины логарифмической фазы роста инкубировали с соединением TP053 (50 мкг/мл) в течение 48 часов при 37°C, после чего осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 20 мин), гомогенизировали с кремниво-циркониевыми бусами на дезинтеграторе BeadBeater (Biospec, США). В качестве образца сравнения использовали необработанные соединением TP053 клетки *M. tuberculosis* H37Rv, подготовленные аналогичным образом. Клеточный гомогенат и супернатант, полученный после центрифугирования культуры, объединяли и трижды экстрагировали хлороформом. Полученный экстракт фильтровали через подушку из силикагеля, растворитель удаляли под вакуумом. Концентрированный экстракт исследовали методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS) на приборе Waters Acquity UPLC, а также методом тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем (ТСХ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Модель покоящегося состояния клеток *M. tuberculosis*, имитирующих латентную ТБ инфекцию, и характеристика покоящихся клеток

Известно, что ПФ микобактерий, характеризующиеся экспериментально невыявляемым уровнем метаболической активности, особенностями ультраструктурной организации, устойчивостью к антибактериальным и другим повреждающим агентам (Wayne *et al.*, 1996, Betts *et al.*, 2002, Deb *et al.*, 2009, Shleeva *et al.*, 2011), формируются как ответ на стрессовые воздействия и неоптимальные условия окружающей среды. В тех случаях, когда неоптимальные условия имеют особенно неблагоприятный или пролонгированный характер, ПФ приобретают свойство «некультивируемости» – временной утраты способности образовывать колонии на стандартных средах (Dhillon *et al.*, 2004, Young *et al.*, 2005, Sala *et al.*, 2010). В результате скрининга ряда стрессовых факторов было обнаружено, что одним из способов индукции формирования покоящегося состояния *M. tuberculosis* является дефицит ионов калия в среде культивирования, что сопровождается существенным снижением колониеобразующей способности. Через 40 суток инкубации в синтетической среде Сотона, содержащей все необходимые ростовые добавки, но не содержащей ионов калия, число КОЕ снижалось более чем на 4 порядка (рис. 1А). Внесение рифампицина в культуру, находящуюся в стационарной фазе

роста, позволило получить *in vitro* популяцию покоящихся клеток, полностью утративших колониобразующую способность (КОЕ=0) (рис. 1Б). При этом покоящиеся клетки оставались жизнеспособными и сохраняли высокий потенциал реверсии к вегетативному росту. При переносе их в полноценную среду, содержащую ионы калия, количество клеток, восстановивших свою способность к делению и росту, оцененное методом наиболее вероятных чисел (НВЧ), составило не менее $2 \cdot 10^7$ клеток/мл (рис. 1Б), или 25-30% от числа клеток стационарной культуры.

Клетки, утратившие способность образовывать колонии (DM и DL) (рис 1Б), характеризовались существенным изменением морфологии (рис. 2). По этому признаку популяция ПФ была гетерогенной, большинство «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis* выглядели как укороченные палочки с угощенной клеточной стенкой, уплотненной цитоплазмой и компактизованным нуклеоидом. Также в покоящихся клетках резко сокращалось количество рибосом.

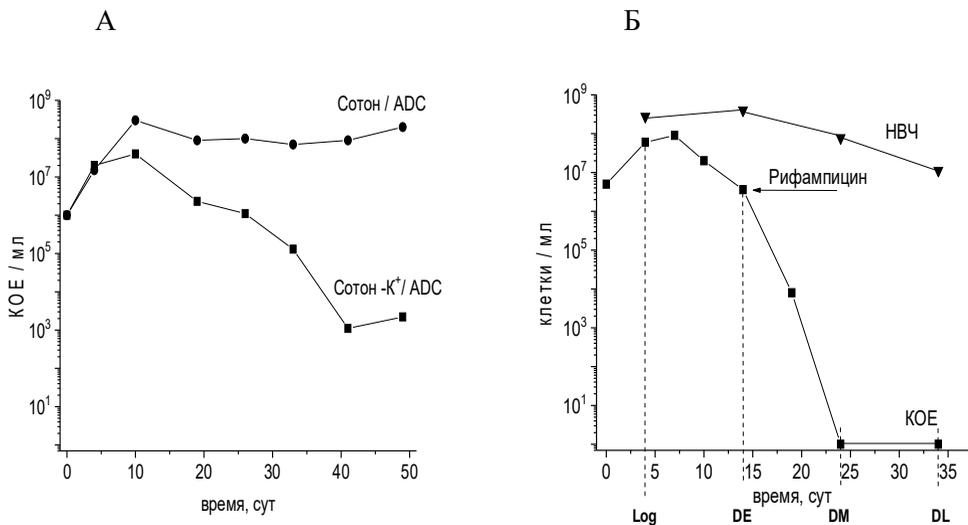


Рис. 1. Переход клеток *M. tuberculosis* в состояние покоя *in vitro* в условиях отсутствия калия: А – снижение числа колониобразующих единиц (КОЕ) при культивировании бактерий в синтетической среде Сотона с добавлением и в отсутствие калия; Б – полная утрата колониобразующей способности в отсутствие калия и при добавлении рифампицина, НВЧ показывает количество жизнеспособных клеток при их переносе в полноценную питательную среду.

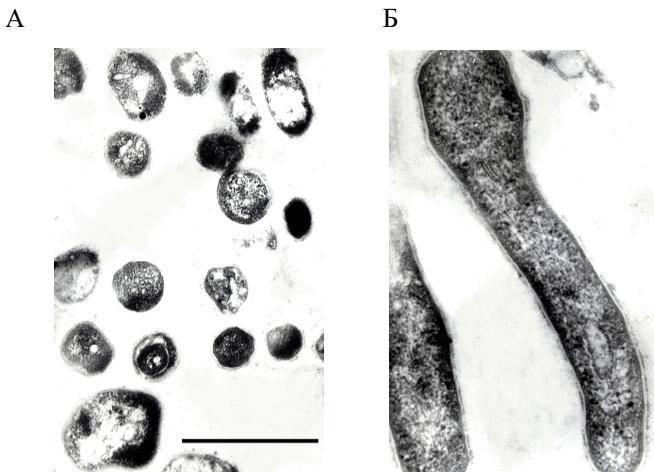


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия: А – покоящиеся клетки *M. tuberculosis*, утратившие способность образовывать колонии (стадия DM); Б – культивируемые клетки стационарной фазы роста. Длина масштабной метки 1 мкм.

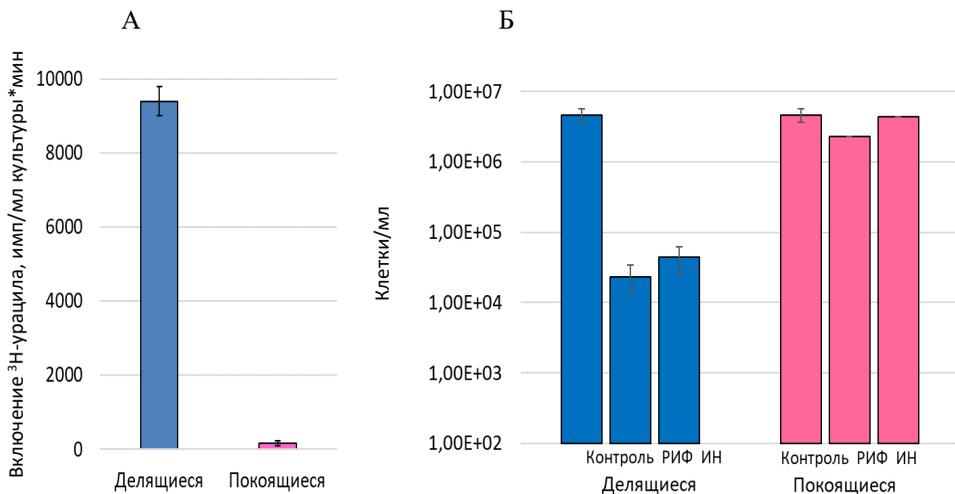


Рис. 3. Характеристики делящихся и покоящихся клеток *M. tuberculosis* с КОЕ=0 (стадия DM): А – уровень включения ^3H -урацила; Б – чувствительность к противотуберкулезным препаратам. Жизнеспособность определяли методом НВЧ.

Оценка уровня включения ^3H -урацила в покоящиеся клетки на стадии DM и DL показала, что он был примерно в сто раз ниже по сравнению с активно делящимися клетками (рис. 3А). Уровень дыхательной активности и синтеза АТФ в покоящихся клетках находился в области недетектируемых значений, что свидетельствует об экспериментально неопределяемом уровне активности центральных метаболических процессов (дыхание, транскрипция, энергетический метаболизм).

Покоящиеся клетки, полученные в этой модельной системе, характеризовались высокой устойчивостью к действию двух основных противотуберкулезных препаратов первой линии – рифампицина и изониазида (рис. 3Б), что также является одной из ключевых характеристик *M. tuberculosis* при латентной инфекции.

Таким образом, предложенная модель получения *in vitro* покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, которые по своим характеристикам соответствуют состоянию латентной ТБ инфекции, развивающейся в живых организмах, позволяет получать клетки для изучения транскриптома покоящегося состояния *M. tuberculosis*, и является адекватным инструментом для поиска соединений, эффективных в отношении латентной формы ТБ.

2. Изучение профиля транскрипции клеток *M. tuberculosis*, переходящих в состояние покоя и «некультивируемости»

2.1. Анализ транскриптомов клеток *M. tuberculosis* в различных стадиях покоя

Транскрипционные профили покоящихся клеток *M. tuberculosis* получали методом RNA-seq в ранней стадии их образования (DE, dormant early) на 15 сут культивирования в среде, дефицитной по ионам калия, когда снижение числа КОЕ только началось, средней стадии покоя (DM, dormant middle) – через 10 сут культивирования с РИФ, то есть через 25 сут от начала культивирования, и поздней стадии покоя (DL, dormant late) – через 10 сут пребывания клеток в состоянии «некультивируемости» или 35 сут от начала культивирования (рис. 1Б). В качестве референсного образца использовали РНК, выделенную из клеток микобактерий, логарифмической фазы роста (Log).

Сравнительный анализ транскриптов, полученных посредством полного транскриптомного секвенирования (RNA-seq), в процессе развития состояния покоя выявил в образцах РНК, соответствующих стадиям DM и DL, значительно меньшее удельное содержание белок-кодирующих транскриптов (табл. 1), что свидетельствует о существенном снижении уровня мРНК и падении транскрипционной активности.

Таблица 1 – Содержание различных видов транскриптов (%) в исследуемых образцах рННК

Виды транскриптов	Log	DE	DM	DL
Белок-кодирующие транскрипты	80,1	60,2	12,3	18,5
тРНК	3,3	1,7	41,5	13,8
4.5SPНК и tmРНК	14,9	26,3	41,0	61,3
Межгенные РНК	1,6	11,8	5,1	6,4

Результаты полнотранскриптомного секвенирования обычно представляют в виде значений RPKM (reads per kilobase of gene per million mapped reads, или число прочтений, отнесенное к длине транскрипта и к 10^6 картированных прочтений), что основано на предположении об одинаковом содержании мРНК в сравниваемых между собой образцах. Так как содержание мРНК в образцах DM и DL клеток оказалось значительно ниже чем в образцах Log и DE (табл. 1), необходима была корректировка полученных результатов. Для этого оценку изменения количества мРНК в транскриптомах проводили с помощью обратной количественной ПЦР, определяя уровни экспрессии наиболее высокоэкспрессированных генов: Rv0789c, Rv0834c, *pip*, Rv1101c, Rv1405c, Rv1526c, Rv1661, *sigA*, *ald*, *glnD*, Rv3197, *espE* в точках Log, DE, DM и DL. Уровни их экспрессии нормировали относительно уровня экспрессии гена 16S рРНК, количество которой, в отличие от мРНК, оставалось на постоянном уровне вне зависимости от физиологического состояния клеток.

На основании данных количественной ПЦР и значений RPKM определили изменения количества мРНК в покоящихся клетках по сравнению с образцом Log: количество мРНК в образце DE уменьшилось в 4-5 раз, а в образцах DM и DL – 30-50 раз (рис. 4). Таким образом, покоящиеся клетки, утратившие способность к колониеобразованию, характеризовались существенно более низким содержанием белок-кодирующих транскриптов.

Хотя количество 16S рРНК в состоянии покоя оставалось постоянным, методом гель-электрофореза была выявлена фрагментация 23S рРНК в клетках образцов DE, DM и DL, соответствующих последовательным стадиям покоя (рис. 5). По данным нозерн-блоттинга, основная точка фрагментации расположена между 592 и 593 нуклеотидом от 5'-конца 23S рРНК, и почти половина молекул 23S рРНК в клетках стадии DM была фрагментирована. Фрагментация 23S рРНК, начавшаяся в культуре DE, была максимально выражена в клетках DM и DL. Структурные изменения в трансляционном аппарате покоящихся клеток, скорее всего, связаны с механизмом формирования состояния метаболического покоя.

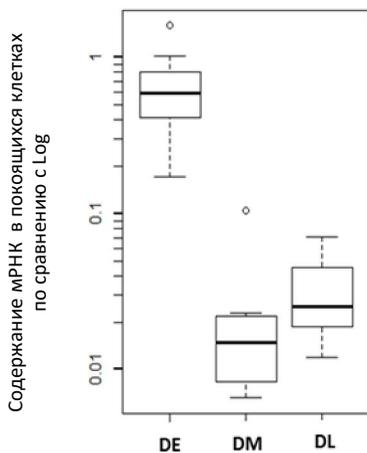


Рис. 4. Снижение количества мРНК в клетках *M. tuberculosis* в процессе развития покоящегося «некультивируемого» состояния (DE, DM и DL) по сравнению с количеством мРНК в клетках экспоненциальной фазы роста (Log) (нормализовано относительно 16S рРНК).

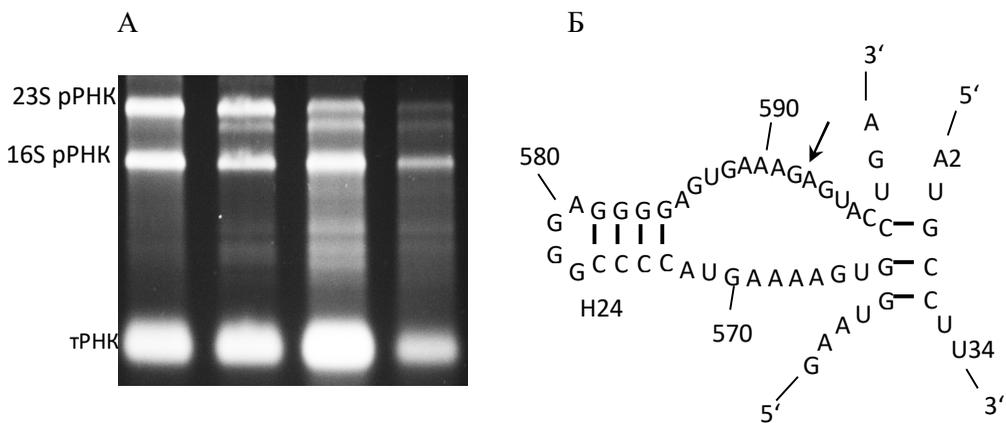


Рис. 5. Фрагментация 23S рРНК в клетках различных стадий формирования состояния покоя: А – электрофоретическая детекция фрагмента 23S рРНК; Б – идентификация точки фрагментации.

Так как классический анализ транскриптомов на основе оценки дифференциальной экспрессии генов (fold-change), был неприменим для покоящихся клеток *M. tuberculosis*, характеризующихся полной потерей колониобразующей способности, было изучено изменение доли отдельных транскриптов в транскриптоме клеток различных стадий покоя. Идентифицировали гены, уровень экспрессии которых отличался более чем в 2 раза. Попарное сравнение транскриптомов клеток различных стадий формирования покоящегося состояния: (1) Log и DE, (2) DE и DM, (3) DM и DL, выявило адаптационные изменения, связанные с: начальным этапом формирования покоящегося состояния, утратой клетками колониобразующей способности, и с пребыванием в состоянии «некультивируемости».

2.2. Транскрипционные изменения клеток начального этапа развития покоящегося состояния (сравнение транскриптомов Log и DE)

Переход клеток в стадию покоя DE привел к снижению уровня транскрипции генов, кодирующих сукцинат-дегидрогеназный комплекс (*sdhABCD*) и NADH-дегидрогеназный комплекс I (*nuoA-N*). При этом в клетках ранней стадии покоя количество транскриптов генов, кодирующих компоненты NADH-дегидрогеназного комплекса II, либо увеличивалось (*ndh*), либо оставалось без изменений (*ndhA*) по сравнению с клетками Log (рис. 6А). Также наблюдалось снижение количества транскриптов участка пути цитохрома *c* в цепи электронного транспорта, таких как комплекс *asbC1* (*qcrCAB*) и цитохром *c*-оксидаза типа *aa3* (*ctaBCDE*). Напротив, количество транскриптов генов, кодирующих цитохром *bd* (*cydABCD*) сохранялось на одном уровне в клетках DE и Log. Снижение в клетках DE числа транскриптов генов, кодирующих компоненты F0F1-АТФ-синтазы, транспортные комплексы Msc1 и Msc4, а также белки, участвующие в транспорте фосфатов, свидетельствовало о существенном падении активности энергопроизводящих процессов уже на ранней стадии развития покоящегося состояния. Также наблюдалось увеличение количества транскриптов генов, кодирующих белки семейства PE-PGRS (51 из 62 генов) в транскриптоме клеток стадии DE, при этом большинство из них сохраняли эту тенденцию и далее, в клетках DM и DL, где количество соответствующих транскриптов также составляло значительную долю в транскриптоме.

2.3. Транскрипционные изменения, связанные с утратой клетками колониеобразующей способности (сравнение транскриптомов DE и DM)

У «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis* с КОЕ=0 (стадия DM), количество транскриптов генов, кодирующих ферменты цикла Кребса, глиоксилатного и метилмалонатного путей, было значительно снижено (рис. 6А), причем первые признаки этого обнаруживались в клетках культуры фазы DE. Была снижена доля транскриптов генов, кодирующих рибосомные белки. При этом доля транскриптов, соответствующих ключевым ферментам глиоксилатного и метилмалонилового путей: изоцитратлиазае, кодируемой геном *icl1*, и метилмалонил-КоА-мутазае, кодируемой геном *mutAB*, была на достаточно высоком уровне, и оставались таковой в клетках фаз DM и DL. Единственной группой генов, показавшей статистически значимое повышение доли соответствующих транскриптов в клетках DM, были *cobJHKLМ* – гены, кодирующие ферменты синтеза витамина B12 (рис. 6Б).

2.4. Транскрипционные изменения, вызванные состоянием персистенции покоящихся клеток (сравнение DM и DL)

Хотя микобактерии в фазах DM и DL характеризовались одинаково низким содержанием мРНК, а также сходными профилями транскрипции, были идентифицированы 293 гена, доля транскриптов которых в транскриптоме DL отличалась в более, чем в два раза, по сравнению с DM как в сторону увеличения, так и уменьшения. Так, доля транскриптов, соответствующих кластеру генов *mmpL10*, продолжала снижаться при переходе клеток из стадии покоя DM в стадию DL (рис. 6А). Неожиданным было обнаружить, что доля транскриптов ряда генов, кодирующих ферменты некоторых биосинтетических процессов, в том числе *ribD* (биосинтез рибофлавина), *cysO* (биосинтез цистеина), *grcC2* (полипиренилдифосфатсинтаза) и *pckA* (железо-регулируемая фосфоенолпируват карбоксикиназа – скорость-лимитирующий фермент глюконеогенеза), была выше в клетках на стадии покоя DL по сравнению с клетками стадии DM. Число транскриптов некоторых генов, участвующих в метаболизме липидов и жирных кислот, таких как *desA2* и *desA3* (десатуразы), *fadE23* и *fadE24* (ацетил-КоА-дегидрогеназы), *ech14* (еноил-КоА-гидратаза), *fabD* (малонил-КоА-гидратаза), *hsaE* (деградация липидов) и *pks10* (халькон-синтаза), оставались на одинаковом уровне в клетках обеих стадий DM в DL, то есть характеризовались высокой стабильностью в условиях отсутствия транскрипции *de novo*.

Важно отметить, что доля транскриптов некоторых генов, принимающих участие в экспрессии и функционировании рибосомных белков, в том числе *rpmJ* и *rpmI*, *rpsQ* и *rpsM*, *rplK* и *rbfA* (факторы, связывающие рибосомы), *greA* (фактор элонгации транскрипции), а также сигма-фактор *sigL* и антисигма-фактор *rsbW*, увеличивалась в транскриптоме клеток пролонгированного покоя стадии DL. Доля транскриптов генов, вовлеченных в адаптацию и репарацию клеток, включая гены, кодирующие шапероны, белки теплового шока и токсин-антитоксиновые модули, также оказалась более значительной в клетках DL по сравнению с клетками DM. К этой группе относятся *msrB* (метионинсульфоксидредуктаза), *serB1* (фосфосеринфосфатаза), *hsp* (белок теплового шока), *htrX* (пептидаза, участвующая в адаптации), *clpB* (АТФ-зависимая эндопептидаза), *pip* (белок, ответственный за высвобождение пролина из коротких пептидов), *vapBC10*, *vapBC20*, *vapBC30*, *vapB13* (токсин-антитоксиновые модули), *cyp132* и *cyp130* (белки детоксикации), *gcvB* (глициндегидрогеназа, деградирующая белки), *tra* (протеасома).

Таким образом, в клетках, находящихся в состоянии покоя и характеризующихся полной утратой колониеобразующей способности, обнаружен пул стабильных во времени транскриптов, сохраняющихся в отсутствие транскрипции *de novo*, которые, по-видимому, могут быть использованы покоящейся клеткой в процессе реактивации и реверсии к ростовым процессам и названные «запасенными транскриптами».

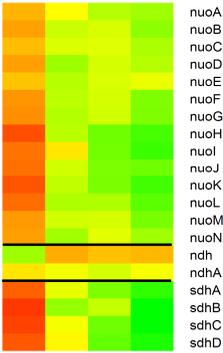
2.5. Некодирующий транскриптом

При анализе транскриптомов клеток DE, DM и DL было обнаружено возрастание в них доли межгенных транскриптов (малых РНК и 5'- и 3'-нетранслируемых областей, НТО) и антисмысловых РНК-белок-кодирующих транскриптов по сравнению с транскриптомом активно делящихся клеток, что указывает на лучшую сохранность молекул малых некодирующих РНК по сравнению с белок-кодирующими транскриптами в условиях отсутствия их синтеза *de novo* (табл. 1).

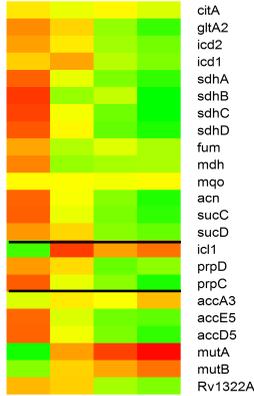
Как показал анализ в динамике, проведенный методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией, наибольшую долю некодирующего транскриптома покоящихся клеток *M. tuberculosis* составляли транскрипты малых некодирующих РНК MTS0997, MTS1338 и MTS2823 (рис. 7). При этом уровень экспрессии MTS0997 в клетках DE было таким же, как и в клетках Log, но заметно снижалось в клетках DM и DL. Уровень экспрессии MTS2823 был максимальным в точке DE, в то время как уровень экспрессии MTS1338 оставался одинаковым на всех стадиях.

A

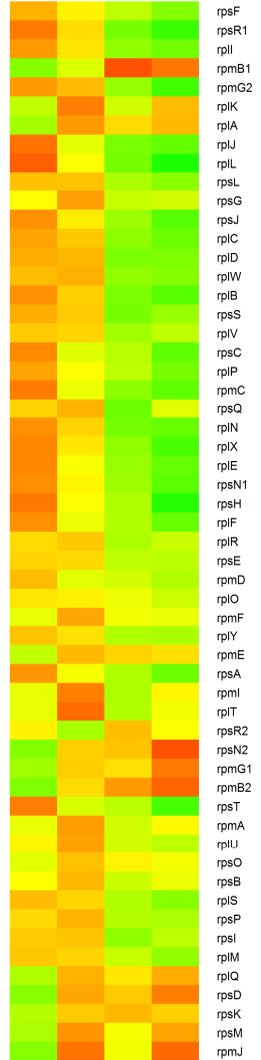
Комплексы НАДН и сукцинатдегидрогеназы



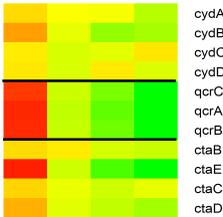
Цикл Кребса, глиоксилатный цикл и метилмалонатный путь



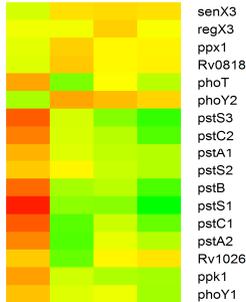
Рибосомные белки



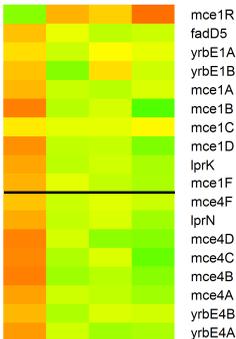
Цитохромы *bd*, *bc1* и цитохром С оксидаза



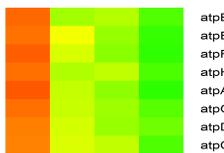
Транспорт фосфатов



Транспортные комплексы Mce1 и Mce4



АТФ-синтаза F0F1



Log DE DM DL

Log DE DM DL

Log DE DM DL

Б

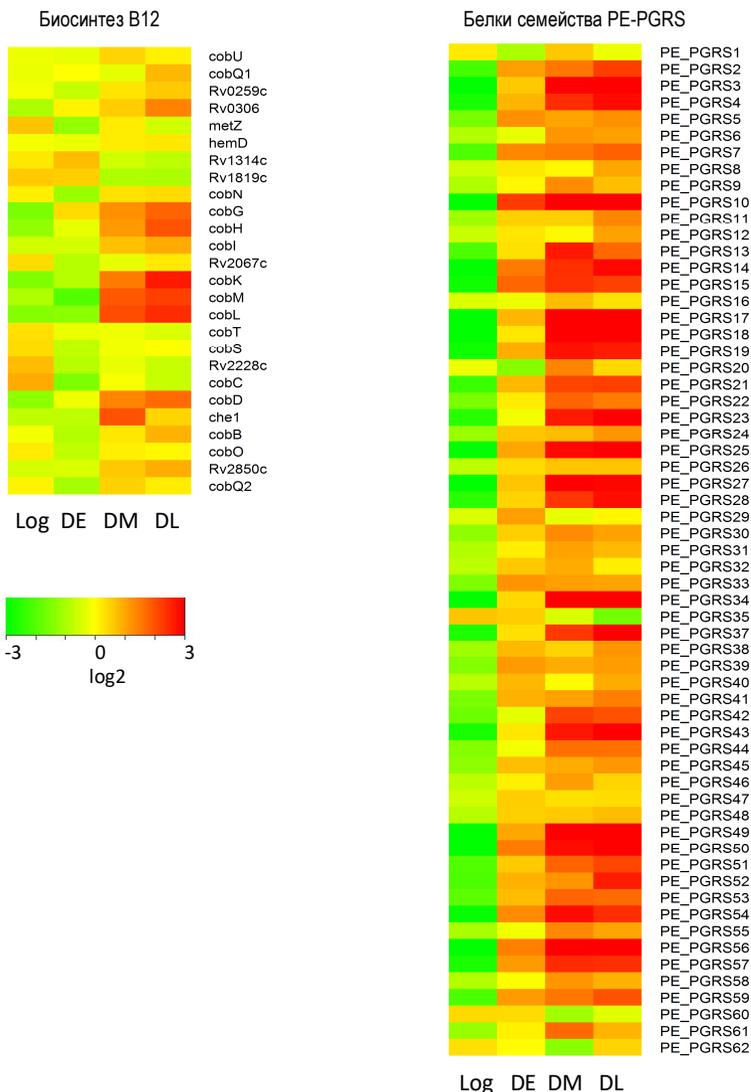


Рис. 6. Дифференциальная экспрессия генов *M. tuberculosis* в клетках различного физиологического состояния: А – гены, доля транскриптов которых снижалась в покоящихся клетках; Б – гены, доля транскриптов которых в покоящихся клетках оставалась на существенном уровне.

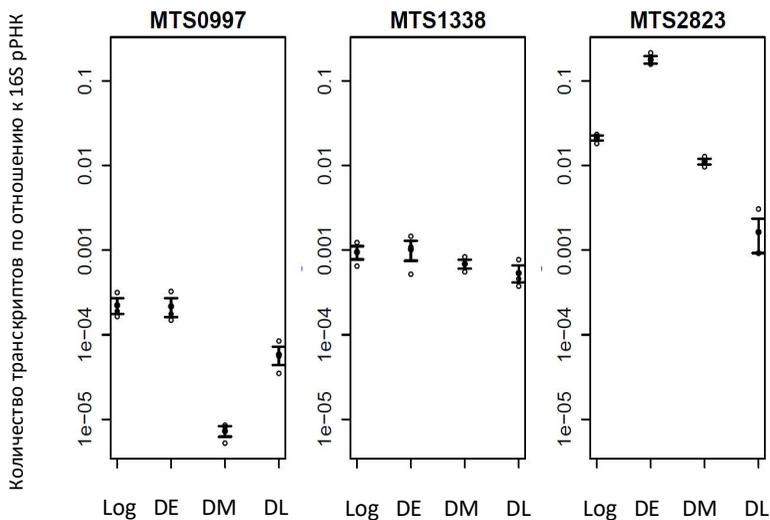


Рис. 7. Уровни экспрессии малых некодирующих РНК MTS0997, MTS1338 и MTS2823 в клетках различных стадий развития покоя. Уровень экспрессии определяли с помощью обратной количественной ПЦР; уровень экспрессии 16S рРНК использовали в качестве референсного образца. Представлены средние значения уровней экспрессии и стандартное отклонение для трех повторов.

2.6. Возможные функции малых некодирующих РНК MTS0997 и MTS1338 в метаболизме *M. tuberculosis*

Были сконструированы штаммы *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией малых некодирующих РНК MTS0997 и MTS1338. Обнаружили, что гиперэкспрессия MTS0997 и MTS1338 приводила к подавлению роста культур, особенно выраженный эффект наблюдался для штамма *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией MTS1338 (рис. 8). Этот результат позволяет предположить, что одной из функций исследуемых малых некодирующих РНК может быть замедление метаболизма клеток *M. tuberculosis* при переходе от метаболически активного состояния к состоянию покоя.

Однако использование специально полученных нами мутантных штаммов *M. tuberculosis* с делецией генов малых РНК Δ MTS0997 и Δ MTS1338 не подтвердило высказанного предположения, заметных различий в росте делетированных штаммов по сравнению с ростом штамма дикого типа в стандартных условиях обнаружено не было.

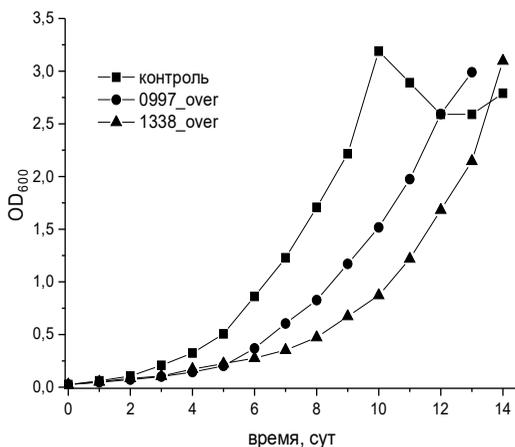


Рис. 8. Влияние гиперэкспрессии малых РНК MTS0997 и MTS1338 на скорость роста *M. tuberculosis*. Контролем служил штамм *M. tuberculosis*, содержащий вектор pMV261 без вставки.

При изучении способности штаммов Δ MTS0997 и Δ MTS1338 образовывать покоящиеся «некультивируемые» клетки в условиях недостатка калия, а также при реактивации ПФ в полноценной среде было обнаружено, что делеция данных генов не влияет на оба эти процесса. По-видимому, как переход клеток в покоящееся состояние, так и их реверсия к росту затрагивают множественные, взаимозаменяемые, дублирующие метаболические пути, и только реальный избыток MTS1338 при гиперэкспрессии дает четко выраженный фенотип.

Подводя итог этому разделу работы, отметим, что покоящееся состояние клеток *M. tuberculosis*, формирующееся в условиях дефицита калия, характеризуется глобальным снижением транскрипционной активности с сохранением немногочисленной группы транскриптов, которые сохраняются в клетках в отсутствие синтеза *de novo*, хотя и на сниженном уровне. Эти «запасенные транскрипты», по-видимому, могут быть использованы покоящейся клеткой при реактивации и реверсии к ростовым процессам. Также было обнаружено, что, кроме белок-кодирующих транскриптов, транскриптом покоящихся микобактерий обогащен транскриптами малых некодирующих РНК, которые, предположительно, могут участвовать в замедлении клеточного метаболизма при развитии состояния покоя.

3. Изучение профиля транскрипции покоящихся клеток *M. tuberculosis* при их реактивации и реверсии ростовых процессов

3.1. Реактивация покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*

Для исследования особенностей транскрипционной активности клеток *M. tuberculosis* при их выходе из состояния покоя и переходе в метаболически активное состояние анализировали транскрипционные профили «оживающих» бактерий в динамике через 1, 2, 4 и 7 суток реактивации в полноценной среде и сравнивали с транскриптомом клеток, находящихся в состоянии покоя.

Процесс реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis* начинался сразу после их переноса в полноценную среду, содержащую калий, о чем свидетельствовало увеличение уровня включения в клетки радиоактивно меченого ^3H -урацила (рис. 9). Хотя включение ^3H -урацила указывало на инициацию транскрипции *de novo*, однако, в течение как минимум 6 суток от начала реактивации в культуре не происходило ни деления клеток, ни их интенсивного роста, о чем свидетельствует отсутствие изменений оптической плотности культуры (рис. 9). При этом число КОЕ в культуре резко увеличилось уже в первые часы после переноса бактерий в полноценную среду, что указывает на процесс «оживления» покоящихся клеток, и постоянно продолжало расти, достигнув величины $5,7 \cdot 10^7$ КОЕ / мл через 7 суток (рис. 9)

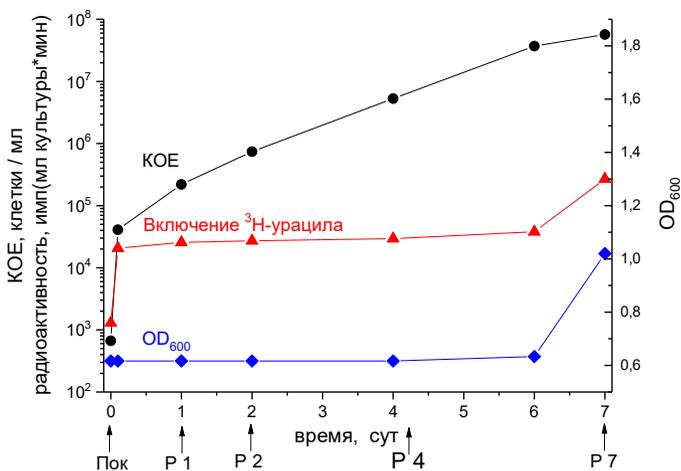


Рис. 9. Изменение КОЕ, НВЧ, оптической плотности культуры и уровня включения ^3H -урацила на различных этапах реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*.

Оценка «кажущегося времени генерации» (удвоения числа КОЕ) выявила постепенное увеличение времени генерации с 2,8 ч в первые сутки реактивации до 16 ч на 6-7 сутки. Так как время генерации клеток *M. tuberculosis* в экспоненциально растущих культурах составляет от 18 до 20 ч, столь низкие его величины в начале реактивации свидетельствуют о существенном преобладании процесса «оживления» клеток над их ростом и последующим делением (рис. 9). Отметим, что уровень метаболической активности клеток, оцененный по включению ^3H -урацила, был достаточно низким вплоть до 7 суток инкубации, что, во-первых, подтверждает вывод о преобладании процесса «оживления» над процессом деления клеток по крайней мере в течение 6 суток (рис. 9), и, во-вторых, свидетельствует о гетерогенности покоящейся популяции. Существенное увеличение включения ^3H -урацила на 7 сутки реактивации соответствует началу роста оптической плотности «оживающей» культуры, что соответствует процессу деления клеток.

3.2. Изменения транскрипционного профиля реактивируемых клеток *M. tuberculosis*

Сравнительный транскриптомный анализ показал существенную активацию транскрипции уже в первые сутки инкубации покоящихся клеток в полноценной среде с калием, что значительно опережало начало клеточного деления (табл. 2). Для 84 белок-кодирующих генов была обнаружена более чем трехкратная активация транскрипции уже в первые сутки реактивации (точка P1). Повышение уровня транскрипции наблюдалось для генов, кодирующих ферменты системы синтеза жирных кислот типа I (FASI) и типа II (FASII), редокс-чувствительный фактор транскрипции WhiB6 и регулятор транскрипции Rv3830c, принадлежащие к семейству TetR, а также гены, кодирующие маркеры стрессового ответа, такие как *hsp*, кодирующий белок теплового шока, и ферменты репарации, такие как *clpB*, кодирующий эндонуклеазу, которая удаляет окисленные белки, и *msrB*, кодирующий пептидметионин сульфоксидредуктазу, репарирующую белки, инактивированные окислением. Повышение уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, таких как *trxBI*, кодирующего тиоредоксин, обратимо окисляющий дитиол, диоксигеназу Rv3161c, оксидоредуктазы Rv3352c, Rv0369c и Rv0370c, а также акцепторы электронов – флавопротеины Rv2250A и Rv2251, позволяет говорить о выраженном окислительно-восстановительном дисбалансе на раннем этапе реактивации ПФ.

Транскрипционный профиль реактивируемых клеток *M. tuberculosis* на 2 сутки их инкубации в свежей полноценной среде (точка P2) проявлял существенное сходство с транскриптомом клеток P1, но количество генов с повышенной экспрессией увеличилось. Отметим, что гены, транскрипты которых были идентифицированы как стабильные «запасенные транскрипты» ПФ, не активировались с такой скоростью, что предполагает возможность их использования на этом этапе реактивации покоящихся клеток.

Таблица 2 – Функциональные категории генов, транскрипция которых существенно (в 3 и более раз) активируется при реактивации *M. tuberculosis* по сравнению с стоянием покоя.

Категории генов	Этапы реактивации			
	P1	P2	P4	P7
	84 гена	117 генов	173 гена	514 генов
Биосинтез миколовых и жирных кислот	11	8	6	3
Шапероны	1	4	3	2
Вирулентность и системы секреции	6	6	6	49
Мембранные белки	0	1	1	22
FoF1 АТФ-синтаза	0	0	2	8
Дыхание	0	0	7	14
Цикл Кребса	0	0	2	13
Рибосомные белки	0	0	1	26
Гликолиз и глюконеогенез	0	0	1	3
Репарация ДНК	0	0	0	7
Окислительный стресс	0	0	0	4
Репликация ДНК	0	0	0	4

Спектр генов, транскрипция которых активировалась на поздних этапах реактивации (точки P4 и P7) значительно отличался от спектра генов, активированных на ранней фазе (точки P1 и P2) и демонстрировал активацию ферментов, участвующих в центральном метаболизме и дыхании клеток, что сопряжено с индукцией их размножения. Среди них были гены, кодирующие субъединицы NADH-дегидрогеназы *тиоEFGHIJKLM*, компоненты

дыхательной цепи – железо-серный белок *qcrA*, убихинол-цитохром С-редуктазы *qcrB* и *qcrC*, цитохром С-оксидазу *ctaE*, АТФ-синтазный комплекс *atpA-G*. Активация транскрипции генов, кодирующих ферменты цикла Кребса, таких как *sdhAB* (субъединицы сукцинатдегидрогеназы), *acp* (аконитазу), *sucCD* (субъединицы сукцинил-СоА-синтетазы) и др., указывает на начало его функционирования на 4 сутки реактивации, тогда как активация транскрипции генов *ahpCD*, кодирующих белки, участвующие в реакциях окислительного стресса, свидетельствует о том, что на данном этапе реактивации метаболизм клетки еще не сбалансирован.

В отдельной серии экспериментов были исследованы изменения уровня фрагментированности 23S рибосомальной РНК, обнаруженной в покоящихся клетках. Оценка относительного содержания интактной 23S рРНК, фрагмента 23S рРНК и 16S рРНК в процессе реактивации в динамике показала, что, начиная с 4 суток реактивации, возросло количество нефрагментированной 23S рРНК и уменьшалось количество фрагментов 23S рРНК. Их соотношение достигало максимума на 7 сутки реактивации, что соответствовало началу размножения клеток (рис. 10).

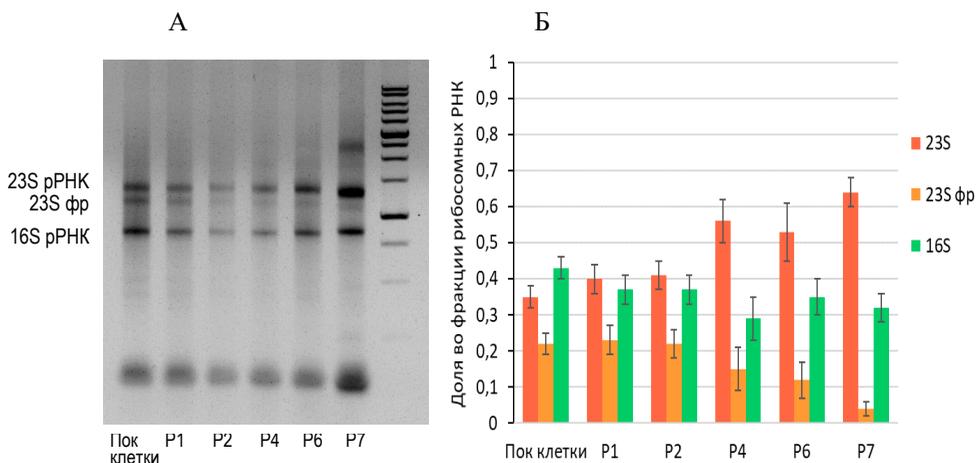


Рис. 10. Снижение уровня фрагментированности 23S рРНК при реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis*: А – электрофоретическая детекция фрагмента 23S рРНК; Б – изменение доли фрагмента 23S рРНК (23S фр) в процессе реактивации.

Таким образом, покоящиеся клетки *M. tuberculosis*, обладающие свойством «некультивируемости», и рассматриваемые как возможные формы персистенции ТБ инфекции, являются крайне метаболически инертной системой, содержащей при этом пул «запасенных транскриптов» белок-кодирующих генов и малых некодирующих РНК. Быстрая активация транскрипции, которая носила лавинообразный характер и была названа нами «транскрипционным взрывом», началась немедленно после переноса покоящихся клеток в свежую полноценную среду, что свидетельствовало о глубине метаболической инертности ПФ *M. tuberculosis*, обратимости этого инертного состояния и гетерогенности популяции покоящихся клеток по глубине покоя, то есть по скорости их отклика на появившиеся условия для роста. С другой стороны, эти данные свидетельствуют об ограниченности традиционного, мишень-ориентированного подхода для поиска лекарственных средств против латентной ТБ инфекции.

Учитывая метаболическую инертность ПФ и неактивное состояние в них установленных ранее молекулярных мишеней действия антибиотиков, постулировано, что поиск веществ, уничтожающих покоящиеся клетки бактерий или ингибирующих их прорастание, должен вестись среди соединений, обладающих свойствами энергонезависимого транспорта в клетку и неселективного ингибирования множественных мишеней, вызывающего их необратимую модификацию. Поиску таких соединений посвящен следующий раздел работы.

4. Поиск соединений, активных против покоящихся клеток *M. tuberculosis*

Как показано выше, покоящиеся клетки *M. tuberculosis*, полученные *in vitro* в условиях дефицита калия, были высокотолерантны к препаратам первой линии для лечения ТБ – рифампицину и изониазиду (рис. 3).

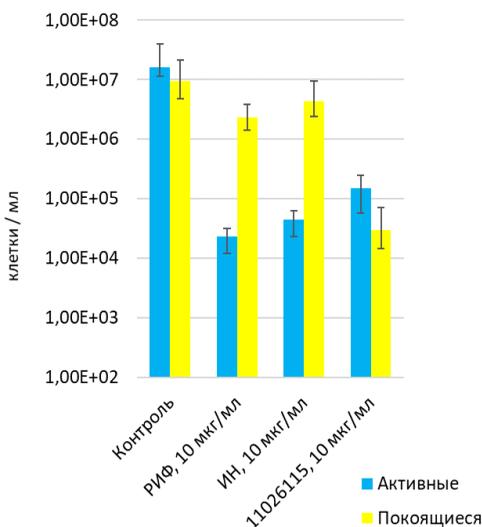
При изучении активности других противотуберкулезных препаратов, включая ципрофлоксацин (препарат второй линии для лечения ТБ, ингибитор ДНК-гиразы), бедаквилин (недавно внедренный в клиническую практику препарат, специфический ингибитор АТФ-синтазы), макозинон (препарат, находящийся на 2 фазе клинических испытаний, ингибитор биосинтеза клеточной стенки микобактерий) (Makarov *et al.*, 2009, Makarov *et al.*, 2014) в отношении покоящихся клеток, также была обнаружена высокая устойчивость к ним микобактерий. Скрининг оригинальных химических соединений с противотуберкулезной активностью, эффективных против покоящихся клеток *M. tuberculosis*, выявил два новых класса перспективных соединений – гидроксипиридинтионы (НРТ) и тиенопиримидины (ТР), механизм действия которых на бактериальные клетки не был известен.

5. Производные гидроксипиридинтионов и механизм их действия

5.1. Бактерицидная активность производных гидроксипиридинтионов в отношении активных и покоящихся клеток *M. tuberculosis*

В ходе скрининга соединений различных классов было обнаружено, что ряд оригинальных производных класса гидроксипиридинтионов (НРТ) был активен не только в отношении делящихся, но и покоящихся клеток *M. tuberculosis*, полученных в модели дефицита калия в среде *in vitro* и имитирующих персистирующую ТБ инфекцию. Так, одно из производных НРТ 11026115 было высокоактивно в отношении делящихся клеток *M. tuberculosis* (МИК=0,250 мкг/мл) и в концентрации 10 мкг/мл снижало жизнеспособность покоящихся клеток на три порядка, тогда как другие антибактериальные агенты в этой концентрации на покоящиеся клетки не действовали (рис. 11).

А



Б

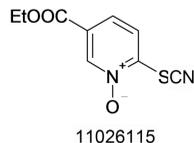


Рис. 11. Соединение 11026115, активное в отношении клеток *M. tuberculosis*: А – бактерицидное действие РИФ, ИН и 11026115 на покоящиеся и активнорастущие клетки, которые инкубировали с антибактериальными агентами в течение 7 сут. Жизнеспособность оценивали методом НВЧ; Б – структура соединения 11026115.

Для поиска более эффективных соединений этого класса были проведены исследования взаимосвязи химической структуры производных НРТ и их активности в отношении клеток *M. tuberculosis*, всего были синтезированы 47 новых производных. Взаимосвязь «структура-активность» изучали по изменению бактерицидного эффекта от введения различных заместителей в положение 5 (R¹) и тио-заместителей в положение 2 (R²) пиридинового кольца. Наиболее активные соединения представлены в таблице 3.

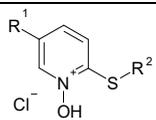
Обнаружено, что введение таких заместителей, как Н и галогены, а также заместителей алифатического ряда в положение 5 пиридинового кольца, приводит к снижению или полному отсутствию активности в отношении *M. tuberculosis*, тогда как наличие в этом положении электроноакцепторных заместителей, таких как этоксикарбонил, трифторметил и т.д., наоборот, обуславливает ее увеличение. Наибольшей активностью обладали соединения, имеющие в своей структуре имидотиокарбаматный фрагмент в положении 2 пиридинового кольца. В результате были получены новые производные НРТ, которые характеризовались активностью в 5-10 раз большей, чем соединение 11026115.

Таблица 3. Активность производных НРТ в отношении клеток *M. tuberculosis* различного физиологического состояния (инкубация с производными в течение 7 сут, число выживших клеток определяли методом НВЧ)

Соединение	Структура		МИК, мкг/мл	Бактерицидный эффект (падение числа выживших клеток, порядки) в присутствии 25 мкМ соединения	
	R ¹	R ²		Активно растущие	Покоящиеся
11126037	EtOOC	C(NH ₂)NH	0,100	1,34-1,54	2,94-3,91
11126038	F3C	C(NH ₂)NH	0,100	1,71-1,92	3,91-4,14
11126040	EtOOC	C(NH-(CH ₂) ₂ N)	0,050	1,91-2,20	3,01-3,42
11126047	F3C	C(NH-(CH ₂) ₂ N)	0,100	2,11-2,41	3,36-4,24
11126121	EtOOC	C(NH ₂)NCH ₂ Ph	0,050	1,72-2,02	2,94-4,00
11126123	F3C	C(NH)NMe ₂	0,050	1,71-1,91	3,22-3,97
11126125	F3C	C(NH ₂)NCH ₂ Ph	0,050	1,91-2,52	2,97-4,24
РИФ			0,050	2,16-2,94	0,43-0,70
ИН			0,010	3,01-3,48	0-0,21

По результатам тестирования, наиболее активными были производные 11126121 и 11126125, обладавшие наименьшими значениями МИК (50 нг/мл) в отношении вегетативных клеток и снижавшие численность жизнеспособных покоящихся клеток на 4 и более порядков. Оценка их цитотоксичности (табл. 4) показала, что в отношении клеточной линии гепатокарциномы HepG2, и, особенно, эпителиальных клеток карциномы легкого человека A549 они проявляли умеренную токсичность (индекс селективности ≥ 100), что делает изучаемые соединения весьма перспективными для дальнейшей работы *in vivo*.

Таблица 4 – Цитотоксичность и индекс селективности наиболее высокоактивных производных НРТ

Соединение			МИК, мкг/мл	Цитотоксичность IC ₅₀ , мкг/мл		Индекс селективности	
	R ¹	R ²		A549	HepG2	A549	HepG2
11126121	EtOOC	C(NH ₂)NCH ₂ Ph	0,050	7,86	3,02	253,55	97,42
11126125	F ₃ C	C(NH ₂)NCH ₂ Ph	0,050	8,24	3,84	265,81	123,87

5.2. Механизм антимикобактериального действия производных НРТ

5.2.1. Конверсия производных гидроксипиридинтионов в слабощелочных условиях. При анализе полученных результатов (табл. 3) было отмечено, что активность НРТ не зависела от характера и свойств конкретного имидокарбамата (R²), его размеров, и была сходной для циклических и линейных алкильных и арильных заместителей. В ходе дальнейшей экспериментальной работы было обнаружено, что НРТ теряют свой имидокарбаматный фрагмент в слабощелочных условиях (рис. 12), возникающих при культивировании микобактерий *in vitro* (Shleeva *et al.*, 2011). Были синтезированы три соответствующих производных НРТ (2a-c) – стабильных и растворимых в слабощелочных растворах, их МИК в отношении активнорастущих *M. tuberculosis* составила 0,05 мкг/мл. Для исследования механизма их действия на клетки *M. tuberculosis* было выбрано соединение 1-гидрокси-5-этоксикарбонилпиридин-2(1H)-тион (НРТ-2b).

5.2.2. Особенности профиля транскрипции клеток *M. tuberculosis* в присутствии НРТ-2b. Прежде всего отметим, что, несмотря на неоднократные попытки получить клетки *M. tuberculosis*, которые были бы резистентны к НРТ-2b и другим высокоактивным производным НРТ, и идентифицировать методами полногеномного секвенирования

мутировавшую мишень в клетке микобактерий, эти эксперименты не увенчались успехом. Этот результат мог свидетельствовать о летальности такой мутации в геноме *M. tuberculosis*. Поэтому был предложен альтернативный подход – исследование полного транскриптома клеток *M. tuberculosis*, инкубировавшихся с НРТ-2b, методом высокопроизводительного секвенирования кДНК с целью оценить вовлеченность различных метаболических путей в ответ клетки на данный антибактериальный агент и пролить свет на механизм его действия.

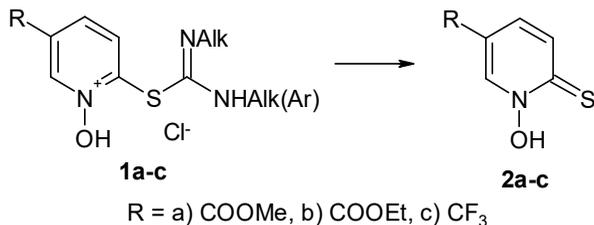


Рис. 12. Отщепление имидокарбаматного фрагмента у высокоактивных гидроксипиридинтионов в слабощелочных условиях.

Полный транскриптомный профиль клеток *M. tuberculosis*, инкубировавшихся с НРТ-2b (3 мкг/мл, 2 ч), полученный методом RNA-seq, показал многократное (в 30 и более раз) увеличение уровня экспрессии таких генов как: *tymT* – металлотионеина, белка-протектора токсического действия меди, координирующего ионы Cu(I); Rv0846 – оксидазы меди, ответственной за резистентность клетки к меди; *csrR* – транскрипционного регулятора, репрессора Cu-чувствительного оперона; *ctpCG&V* – АТФаз, транспортирующих катионы металлов из клетки; *cmtR* – регулятора транскрипции – металлосенсора, *cadI* – кадмий-индуцибельного белка (также индуцирующегося в присутствии ионов других металлов), *arsC* – интегрального мембранного белка, транспортирующего мышьяк и другие катионы, *furA* – маркера стрессового ответа, регулятора импорта Fe и других катионов (табл. 5), а также генов, кодирующих белки с невыявленной функцией: Rv0140, Rv0968, Rv1673c, Rv1993c, Rv1995, Rv2466c, Rv3054c, Rv3269, Rv3463. Оказалось, что аналогичный транскрипционный ответ ранее был выявлен при воздействии на клетки *M. tuberculosis* солей двухвалентной меди в токсичных концентрациях (до 500 мкМ). В этих условиях активировались такие гены как *tymT*, *ctpCG&V*, Rv0846, *cmtR*, *csrR*, *cadI*, *arsC*, *furA* (Ward *et al*, 2008). Эти результаты позволили предположить, что механизм действия НРТ на микобактерии может быть связан с накоплением в клетке ионов меди в токсичных концентрациях.

Таблица 5 – Гены *M. tuberculosis* с максимально повышенным уровнем экспрессии (в 30 и более раз) при действии на клетки НРТ-2b.

Ген	Белок	Функция	Изменение экспрессии (раз)
<u>Регуляторы</u>			
Rv0967	CsoR	Репрессор медь-чувствительного оперона	68,6
Rv1674c		Транскрипционный регулятор	630,4
Rv1909c	FurA	Регулятор поглощения железа	50,8
Rv1994c	CmtR	Регулятор-металлосенсор семейства ArsR-SmtR	172,5
Rv2640c		Транскрипционный регулятор семейства ArsR	97,7
Rv2642		Транскрипционный регулятор семейства ArsR	284,1
<u>Транспортеры</u>			
Rv0849		Транспортный мембранный белок	51,6
Rv0969	CtpV	АТФаза, транспортирующая катионы металлов	31,8
Rv1992c	CtpG	АТФаза, транспортирующая катионы металлов	69,1
Rv2643	ArsC	Мембранный белок, транспортер металлов	78,2
Rv2963		Интегральный мембранный белок	73,4
Rv3270	CtpC	АТФаза, транспортирующая катионы металлов	37,2
<u>Ферменты</u>			
Rv0186A	MymT	Металлотионеин	281,1
Rv0846c		Оксидаза меди	41,9
Rv2641	CadI	Кадмий-индуцируемая глиоксилаза I	294,1
<u>Шапероны</u>			
Rv0251c	Hsp	Белок теплового шока	92,4
<u>Липопротейны</u>			
Rv0847	LpqS	Липопротейн	247,3

5.2.3 Аккумуляция Cu^{2+} в клетках микобактерий в присутствии НРТ. Для проверки высказанной гипотезы определяли концентрацию меди в лизатах клеток *M. tuberculosis*, инкубируемых в присутствии НРТ-2b (10 мкМ) в синтетической среде Сотона, не содержащей меди, или с добавкой 50 мкМ CuBr_2 . Оказалось, что даже на среде без добавки CuBr_2 наблюдалось накопление Cu^{2+} внутри клеток, по-видимому, за счет примесных солей меди, содержащихся в компонентах питательной среды. Внесение в среду Сотона 50 мкМ CuBr_2 привело к многократному возрастанию ее внутриклеточной концентрации, но только в присутствии НРТ (рис. 13А). Важно отметить, что аккумуляция меди в бактериальной клетке имела энергонезависимый характер. Присутствие карбонилцианид хлорфенилгидразона (СССР) – разобщителя окислительного фосфорилирования, не влияло на количество

накапливаемой в присутствии НРТ-2b меди, что указывает на независимость данного процесса от мембранного потенциала клетки.

Также была оценена способность НРТ-2b стимулировать накопление катионов других металлов в клетках *M. tuberculosis*. Клетки инкубировали в среде Сотона с внесением 50 мкМ следующих солей: CoCl_2 , FeCl_2 , NiSO_4 и ZnSO_4 и в присутствии 10 мкМ НРТ-2b в течение 2 часов (рис. 13Б). Оказалось, что присутствие НРТ-2b не влияло на эффективность накопления в клетках *M. tuberculosis* ионов Fe^{2+} и Zn^{2+} , которые легко транспортируются в бактериальные клетки специальными переносчиками железа и цинка (Masiag et al., 2007). При этом ионы Co^{2+} и Ni^{2+} не накапливались в микобактериях ни в отсутствие, ни в присутствии НРТ-2b. Полученные результаты позволяют сделать вывод о селективной способности НРТ-2b транспортировать ионы Cu^{2+} в клетки *M. tuberculosis*, что приводит к накоплению их в токсичных концентрациях.

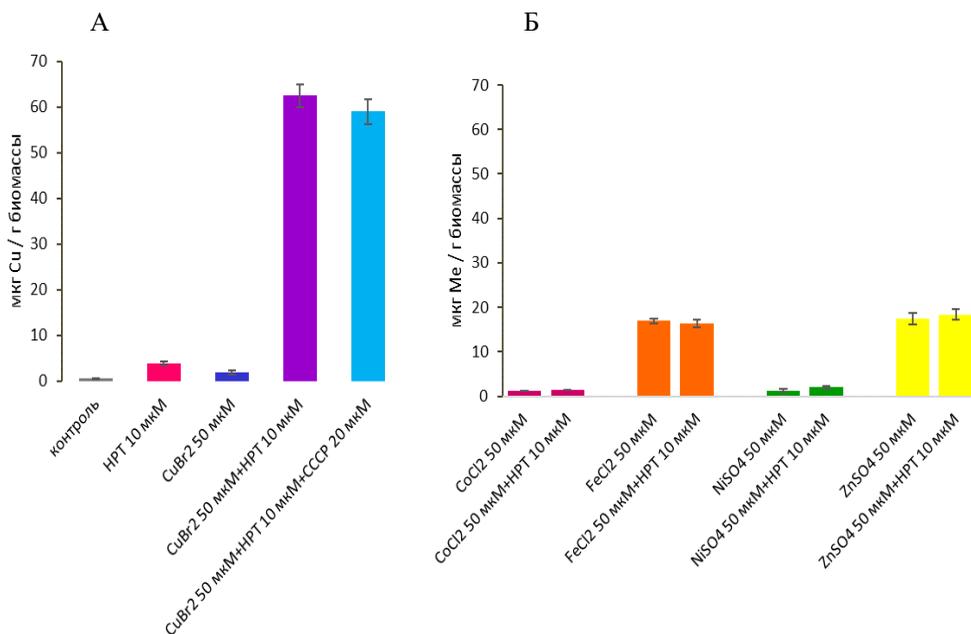


Рис. 13. Оценка содержания металлов в лизате клеток *M. tuberculosis*: А – аккумуляция меди при добавлении 50 мкМ CuCl_2 в присутствии и отсутствие НРТ и СССР; Б – содержание металлов при добавлении 50 мкМ соответствующих солей в присутствии и отсутствие НРТ-2b.

Механизм внутриклеточной аккумуляции меди при участии НРТ обусловлен, по-видимому, их способностью хелатировать катионы меди, содержащиеся в среде культивирования, образуя с ними комплекс в стехиометрическом соотношении 2:1 (рис. 14), что было подтверждено методом ионизационной масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI⁺-MS).

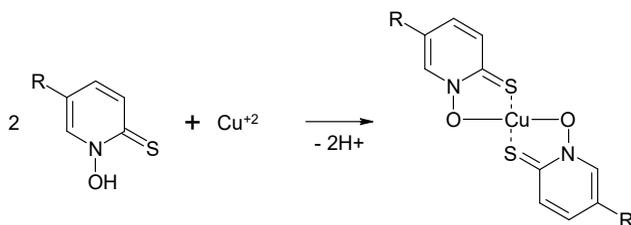


Рис. 14. Образование комплекса НРТ-2b с Cu²⁺ в культуральной среде *M. tuberculosis*.

Следует отметить, что НРТ-2b, характеризующийся структурным сходством с пиритионом, обладал высоким сродством к меди и образовывал стабильный комплекс именно с Cu²⁺, но не с ионами других металлов. По своим физическим свойствам комплексы производных НРТ с Cu²⁺ являются чрезвычайно липофильными. Это обеспечивает их энергонезависимый транспорт в микобактериальные клетки, что, как было отмечено выше, является одним из необходимых свойств антимикробных агентов, эффективных против покоящихся форм. Отметим, что в клетке *M. tuberculosis* комплекс [2НРТ-Cu²⁺] достаточно быстро перестает детектироваться. Уже через 50 часов инкубации микобактерий с НРТ он определяется в лизатах клеток лишь в следовых количествах. Это предполагает, что в клетках микобактерий происходит метаболическая деструкция комплекса [2НРТ-Cu²⁺] с высвобождением ионов Cu²⁺, что было подтверждено дальнейшими экспериментами.

Хотя природа антибактериальных свойств ионов меди до настоящего времени не до конца выяснена, известно о существовании целого ряда низкомолекулярных органических лигандов, обеспечивающих ее широкое неселективное применение в качестве противомикробного средства (Dalecki *et al.*, 2017). К таким лигандам относят 8-гидроксихинолины (Shah *et al.*, 2016), дисульфирам (Bell & Smith, 1949), фенантролины (Feeney *et al.*, 1957) и

др. Однако следует отметить, что ни один из известных медь-зависимых противомикробных препаратов не характеризуется настолько высоким уровнем противотуберкулезной активности, как производные НРТ (МИК 0,1 мкМ), что указывает на чрезвычайно эффективное связывание этими соединениями ионов меди.

Полученные результаты позволяют заключить, что НРТ являются новым перспективным классом высокоактивных противотуберкулезных соединений, приводящих к медь-обусловленной токсичности как у вегетативных, так и у покоящихся клеток *M. tuberculosis*. В соответствии с современными представлениями, токсическое действие меди на клетки выходит за рамки индукции окислительного стресса и повреждения ДНК у бактерий (Dalecki *et al.*, 2017, Dalecki *et al.*, 2015). Фактические молекулярные мишени токсичности меди представлены целым рядом макромолекул, содержащих железо-серные кластеры (Macomber & Imlay, 2009, Chillappagari *et al.*, 2010, Johnson *et al.*, 2015), что соответствует еще одному постулируемому свойству, которым должны обладать препараты, эффективные против покоящихся форм *M. tuberculosis*.

6. Производные тиенопиримидинов и механизм их действия

6.1. Бактерицидная активность производных тиенопиримидинов в отношении активных и покоящихся клеток *M. tuberculosis*

При скрининге противотуберкулезных средств был обнаружен еще один класс оригинальных химических соединений – тиенопиримидинов, проявляющих значительную активность не только в отношении вегетативных, но и покоящихся клеток *M. tuberculosis*. Наиболее перспективное производное этого класса – ТР053 характеризовалось не только низким значением МИК (0,125 мкг/мл), но и выраженным бактерицидным эффектом в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis* (рис. 15).

6.2. Механизм антибактериального действия тиенопиримидинов

Для выяснения механизма действия этого нового класса антимикробных соединений были получены резистентные к ним клоны *M. tuberculosis*. Мутанты получены посевом клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv на плотную питательную среду, содержащую 10 МИК соединения ТР053 (1,25 мкг/мл). Спонтанно устойчивые мутантные клоны появлялись с частотой $1,4 \cdot 10^{-9}$. Один из них, обозначенный #3, обладал особенно высокой устойчивостью к ТР053 (2,5 мкг/мл, 20 МИК). Для идентификации генетической мутации, ответственной за устойчивость клеток спонтанного

мутанта #3 к TP053 было проведено полногеномное секвенирование выделенной из клеток этого клона ДНК. Последующий биоинформатический анализ выявил несинонимичную мутацию G83C в гене Rv2466c *M. tuberculosis*, что приводило к замене триптофана в положении 28 на серин (W28S). Данный ген кодировал белок с неизвестной функцией, и по результатам транспозонного мутагенеза ген Rv2466c был описан как non-essential (несущественный) в штамме *M. tuberculosis* H37Rv (Griffin *et al.*, 2011, Sasseti *et al.*, 2003).

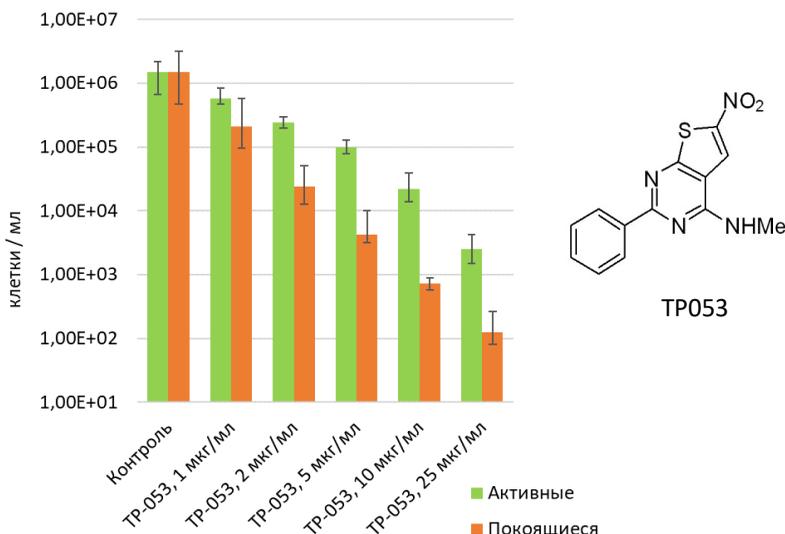


Рис 15. Соединение TP053, активное в отношении клеток *M. tuberculosis*: А – бактерицидное действие соединения TP053 на покоящиеся и активнорастущие клетки, которые инкубировали с антибактериальными агентами в течение 7 сут. Жизнеспособность оценивали с помощью метода НВЧ; Б – структура соединения TP053.

Для определения роли белка Rv2466c в устойчивости *M. tuberculosis* к TP053 был оценен эффект его гиперэкспрессии в клетках *M. tuberculosis*. Ген Rv2466c и ген Rv2466c с заменой W28S были клонированы в экспрессионном векторе pSODIT-2, затем клетки *M. tuberculosis* дикого типа и мутантного штамма, устойчивого к TP053, были трансформированы соответствующими плазмидами. Было показано, что избыточная экспрессия Rv2466c действительно восстанавливает чувствительность клеток мутантного штамма к TP053, подтверждая тем самым комплементарность мутации W28S (табл. 6).

Примечательно, что избыточная экспрессия у штамма дикого типа повышала чувствительность клеток к TP053. Значение МИК уменьшилось в 4 раза по сравнению со значением для клеток *M. tuberculosis*, трансформированных пустым вектором pSODIT-2 или конструкцией с гиперэкспрессией Rv2466c с заменой W28S. Таким образом, полученные экспериментальные данные убедительно показывают, что белок Rv2466c не является мишенью TP053, а требуется для его активации.

Таблица 6. Значения МИК для дикого и мутантного штаммов *M. tuberculosis* при гиперэкспрессии белка Rv2466c

Плазмиды	TP053 МИК (мкг/мл)	
	H37Rv	#3 mutant
pSODIT-2	0,5	>5
pSODIT_Rv2466c	0,125	0,25
pSODIT_Rv2466c_W28S	0,25–0,5	>5

6.2.1 Механизм активации соединения TP053 под действием белка Rv2466c. В предварительных экспериментах было показано, что производные тиенопиримидинов в которых, вместо нитрогруппы присутствует amino-, карбоэтокси- или амидогруппа, не обладают антимикобактериальной активностью. Было высказано предположение, что активность TP053 в отношении *M. tuberculosis* определяется присутствием именно нитрогруппы, и механизм активации этого соединения заключается в высвобождении оксида азота NO, связанном с восстановлением TP053 под действием белка Rv2466c, который, как позднее было показано, является микотиолредуктазой (Rosado et al., 2017). Для проверки этой гипотезы продукт активации соединения TP053, образующийся под действием очищенного рекомбинантного белка Rv2466c, анализировали в реакции с сульфаниловой кислотой и альфа-нафтиламином (реактив Грисса), который позволяет количественно определить уровень NO по концентрации нитритов. Инкубация TP053 в присутствии белка Rv2466c, дитиотеитола (ДТТ) и метанольного экстракта клеток микобактерий, служащего источником микотиола, продемонстрировала убыль количества TP053 в реакционной смеси во времени за счет его восстановления (рис. 16А), что сопровождалось увеличением высвобожденного NO (рис. 16В). В отсутствие в реакционной смеси ДТТ и экстракта *M. smegmatis*, необходимых для активности белка Rv2466c, не происходило ни уменьшения количества TP053, ни образования NO (рис. 16).

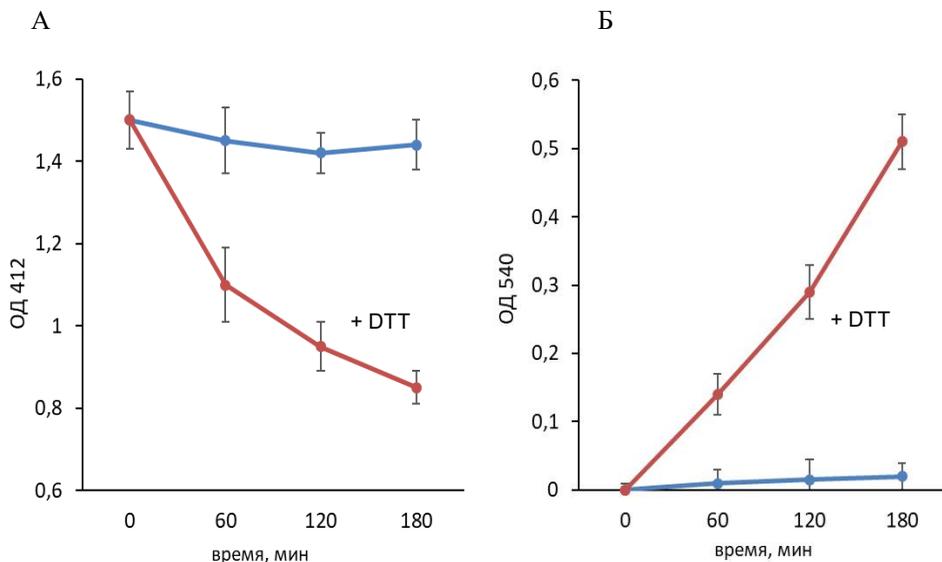


Рис. 16. Восстановление TP053 под действием рекомбинантного белка Rv2466c в присутствии ДТТ:

А – превращение TP053 в присутствии белка Rv2466c; Б – образование NO в процессе восстановления TP053.

Для исследования образования NO клетками под действием TP053 использовали штамм *Mycobacterium bovis* BCG, который инкубировали с TP053 (32 мкг/мл), в положительном контроле – с противотуберкулезным препаратом PA-824 (32 мкг/мл), продуцирующим NO под действием нитроредуктазы Ddn4, и в отрицательном контроле – с ИН (32 мкг/мл). В этих экспериментальных условиях все три соединения вызвали сравнимое ингибирование роста микобактерий, которое в конечный момент опыта составило: TP053 – 25,9%, PA-824 – 31,9%, ИН – 37,1% (рис. 17А). В культурах *M. bovis* BCG, обработанных TP053 или PA-824, высвобождение NO нарастало во времени, тогда как в культуре, обработанной ИН, количество NO было таким же, как и в контрольной культуре.

6.2.3. Изменение профиля транскрипции клеток *M. tuberculosis* под действием TP053. Известно, что мишенями для оксида азота NO являются системы аэробного дыхания и синтеза АТФ. Неселективное действие NO приводит к остановке роста и деления бактерий (Brown, 2001, Manjunatha *et al.*, 2009), что наблюдалось как при обработке клеток *M. tuberculosis* NO *in*

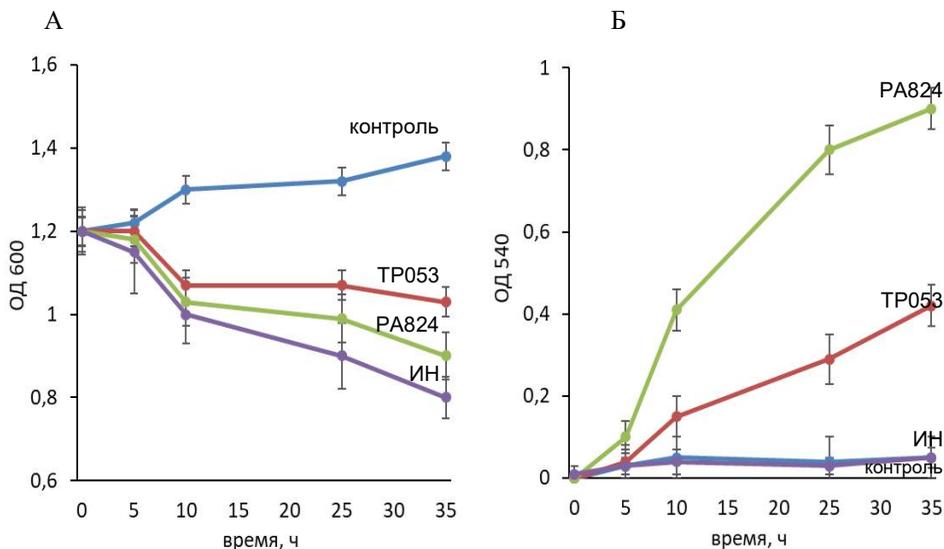


Рис. 17. Бактерицидное действие TP053 на клетки *M. bovis* BCG, обусловленной высвобождением оксида азота: А – кривые ингибирования роста; Б – уровень продукции оксида азота в культуре микобактерий.

in vitro (Voskuil *et al.*, 2003), так и при попадании микобактерий внутрь активированных макрофагов (Schnappinger *et al.*, 2003), продуцирующих NO и ряд других реактивных соединений азота (Darwin *et al.*, 2003). Ингибирование аэробного дыхания, сопровождающееся повышенной регуляцией цитохром-*b*-оксидазы (*cydABCD*) у микобактерий, было ранее отмечено для PA-824, являющегося бивалентным нитроимидазолом, продуцирующим NO (Singh *et al.*, 2008).

В наших экспериментах транскриптом *M. tuberculosis*, полученный методом RNA-seq в присутствии 20 мкМ TP053, выявил дифференциальную экспрессию 546 генов по сравнению с контрольной культурой (изменение уровня экспрессии >2). Ожидается обнаружена повышенная экспрессия гена *Rv2466c*, кодирующего белок-активатор соединения TP053, что доказывает его участие в трансформации этого антибактериального агента. Подавление экспрессии АТФ-синтазы (*atpFH*) и NADH-дегидрогеназы I типа (*nuoABCDEFGHIJKLMN*) (табл. 7), и положительная регуляция субъединиц цитохром-*b*-оксидазы (*cydAB*) и NADH-дегидрогеназы II типа (*ndh*) указывает на ингибирование аэробного дыхания клеток под действием TP053.

Сопутствующая активация транскрипции ряда тиоредоксиновых белков TrxA, TrxB1 и TrxB2 и TrxC, участвующих в различных окислительно-восстановительных реакциях посредством обратимого окисления, подтверждает метаболическую трансформацию пролекарства TP053 в клетках микобактерий туберкулеза (табл. 7).

Также под действием TP053 была обнаружена активация генов Dos-регулона у *M. tuberculosis*. В частности, отмечено повышение регуляции генов *narK2*, *fdxA*, Rv2030c, *hspX*, *acg*, Rv2628, Rv2629, Rv2630, Rv2631, Rv3128c. Ранее отмечалось, что низкие концентрации NO инициируют адаптивный ответ, подобный ответу на гипоксию при переходе клеток *M. tuberculosis* в состояние покоя *in vitro* (Voskuil et al., 2003), в том числе, активацию Dos-регулона, тогда как более высокие концентрации NO имели плейотропное действие, включающее активацию генов, ответственных за окислительный стресс (Voskuil et al., 2003). В наших экспериментах также была обнаружена положительная регуляция генов, кодирующих компоненты пероксинитритредуктазы/пероксидазы (*ahpC* и *ahpD*), индукция которых была детектирована ранее в клетках *M. tuberculosis*, испытывающих NO-опосредованный окислительный стресс в макрофагах (Schnappinger et al., 2003). Активация пероксидазы WroA и Rv3177 (табл. 7) и умеренная индукция каталазы-пероксинитритазы KatG и белка FurA, регулирующего поглощение железа (Voskuil et al., 2003), также указывают на окислительный стресс, имеющий место в клетках *M. tuberculosis* под действием соединения TP053. Интересно, что под действием TP053 также была обнаружена положительная регуляция металлотионеина – белка, координирующего ионы меди Cu (I) в тиолатном ядре. Известно, что NO способен вытеснять медь в токсичной форме Cu (I) из металлотеонеина (Gold et al., 2008), а высвобождение токсичных ионов Cu (I) в присутствии доноров NO приводит к еще более выраженному окислительному стрессу в клетке.

Оксид азота NO, как известно, неселективно ингибирует несколько мишеней, включая ДНК (Manjunatha et al., 2009), поэтому, вполне ожидаемо в присутствии TP053 была также обнаружена положительная регуляция генов, кодирующих белки репарации ДНК Ogt и AlkA (табл. 7). Кроме того, заметно активировались ряд регуляторов транскрипции: Rv0195 и Rv0196, Rv0494, Rv1167c, *whiB3*, *nmtR*, Rv3840, Rv3855 (табл. 7) и несколько токсин-антитоксиновых модулей *higAB* и *vapBC16*, которые могут быть вовлечены в механизмы транскрипции.

Таблица 7. Гены *M. tuberculosis* с существенно (в 4 и более раза) повышенной экспрессией под действием TP053

Ген	Белок	Функция	Повышение экспрессии (раз)
<u>Окислительно-восстановительные реакции</u>			
<i>mrh2</i>	Mrx2	Микотол-зависимая редуктаза	10,70
<i>Rv1470</i>	TrxA	Тиоредоксин	4,26
<i>Rv1471</i>	TrxB1	Тиоредоксин	7,52
<i>Rv3913</i>	TrxB2	Тиоредоксин редуктаза TrxB2	4,06
<i>Rv3914</i>	TrxC	Тиоредоксин	4,99
<u>Дыхание</u>			
<i>Rv1622c</i>	CydB	Цитохром-bd оксидаза, субъединица I	4,20
<i>Rv1623c</i>	CydA	Цитохром-bd оксидаза, субъединица II	3,95
<u>Окислительный стресс и детоксикация</u>			
<i>Rv2428</i>	AhpC	Алкил-гидропероксид редуктаза C	5,43
<i>Rv2429</i>	AhpD	Алкил-гидропероксид редуктаза D	5,39
<i>Rv3473c</i>	BroA	Пероксидаза	7,31
<i>Rv3177</i>		Пероксидаза	37,01
<u>Металлотионеин</u>			
<i>Rv0186A</i>	MumT	Металлотионеин	4,47
<u>Репарация ДНК</u>			
<i>Rv1316c</i>	Ogt	Метилтрансфераза	7,21
<i>Rv1317c</i>	AlkA	Репарирующий фермент	4,35
<u>Модули токсин-антитоксин</u>			
<i>Rv1955</i>	HigB	Токсин	4,06
<i>Rv1956</i>	HigA	Антитоксин	4,50
<i>Rv2231A</i>	VarC16	Токсин	4,06
<i>Rv2231B</i>	VarB16	Антитоксин	3,76
<u>Транскрипционные регуляторы</u>			
<i>Rv0195</i>		Сенсорная часть 2-х компонентной системы	6,06
<i>Rv0196</i>		Регулятор транскрипции	10,48
<i>Rv0494</i>		Регулятор транскрипции	4,59
<i>Rv3416</i>	WhiB3	Регулятор транскрипции типа WhiB	15,35
<i>Rv3840</i>		Регулятор транскрипции	4,92
<i>Rv3855</i>	EthR	Регулятор транскрипции семейства TetR	5,17

Таким образом, транскриптомный ответ клетки *M. tuberculosis* на соединение TP053 указывает на высвобождение оксида азота в результате окислительно-восстановительной трансформации TP053 в клетке с последующим неселективным действием NO, обуславливающим повреждение ДНК, ингибирование дыхания и развитие окислительного стресса.

6.2.4. Метаболическая трансформация соединения TP053 в клетках *M. tuberculosis*. Логично было предположить, что высвобождение оксида азота NO может быть не единственным механизмом воздействия соединения TP053 на клетки *M. tuberculosis*, и что, являясь пролекарством, данное соединение может претерпевать более существенные метаболические изменения в клетках патогена.

Для обнаружения биологически активных метаболитов TP053 был использован штамм *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией активатора TP053 – белка Rv2466с. Культуру выращивали в отсутствие и в присутствии соединения TP053 (50 мкг/мл) в течение 48 ч. Клетки лизировали и проводили экстракцию лизатов хлороформом. Полученные экстракты анализировали методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS). Сравнение спектров контрольной и опытной культур выявило в последнем соединении, предположительно являющееся основным продуктом метаболической трансформации TP053, с молекулярной массой 261. Параллельно очищенные хлороформные экстракты анализировали методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. В экстракте клеток опытной культуры были обнаружены 8 фракций, тестирование антимикобактериальной активности которых выявило единственную фракцию, которая ингибировала рост микобактерий. Эту фракцию элюировали из силикагеля дейтерированным ДМСО. На основании протонных сигналов ЯМР-анализа был сделан вывод, что элюированное соединение, обладающее антимикобактериальной активностью – 2-[4-меркапто-6-(метиламино)-2-фенилпиримидин-5-ил] этанол с массой 261.

Основываясь на результатах исследований высвобождения NO из 2-нитрофурана в восстановительных условиях (Cogolli *et al.*, 1979, Grigoriev *et al.*, 1999) и полученных нами результатах, был предложен возможный путь трансформации соединения TP053 в клетках микобактерий (рис. 18), включающий высвобождение NO и дальнейшее восстановление тиофенового кольца с образованием идентифицированного соединения с M = 261, которое обладало высокореактивной группой –SH (рис. 18).

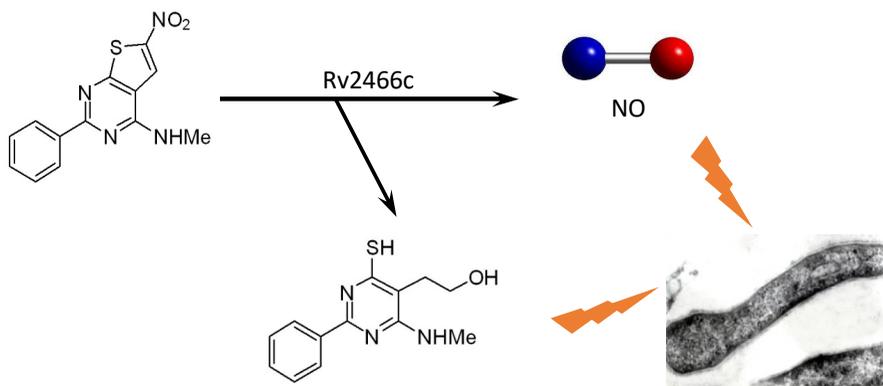


Рис. 18. Схема метаболической активации соединения TP053 в клетках *M. tuberculosis*.

Таким образом, производное класса тиенопиримидинов, соединение TP053, является пролекарством, для проявления антибактериальной активности которого необходимы его метаболические превращения в клетках *M. tuberculosis*, осуществляющиеся под действием белка Rv2466c и сопровождающиеся одновременным выделением оксида азота и образованием метаболита со свободной меркаптогруппой -SH, способной ковалентно связываться с -SH группами ферментов и других биомолекул, инактивируя их. Установленный механизм действия соединения TP053 позволяет рассматривать его как неселективный ингибитор целого ряда метаболических реакций микобактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Покоящиеся клетки *M. tuberculosis*, полученные *in vitro*, обладающие свойством «некультивируемости», и рассматриваемые как формы персистенции *in vivo*, являются крайне метаболически инертной системой. Наряду с такими характеристиками покоящихся форм, как отсутствие экспериментально определяемой метаболической активности и особенности ультраструктурной организации, «некультивируемые» клетки характеризуются глобальным снижением количества мРНК с сохранением небольшой по численности группы транскриптов, названных «запасенными транскриптами», которая включает белок-кодирующие транскрипты и малые некодирующие РНК. Реактивация «некультивируемых» клеток после их переноса в полноценную среду выявила, что ее начальный этап характеризуется существенной активацией транскрипции ряда генов – «транскрипционным взрывом».

Учитывая метаболическую инертность покоящихся форм и неактивное состояние известных молекулярных мишеней действия антибиотиков, предложена стратегия поиска соединений, активных в отношении покоящихся форм бактерий благодаря неселективному ингибированию множественных мишеней патогена и/или их необратимой химической модификации с образованием токсичных для бактериальной клетки продуктов.

В соответствии с предложенной стратегией выявлены два класса оригинальных химических соединений, проявляющих высокую бактерицидную активность в отношении покоящихся клеток *M. tuberculosis*: гидроксопиридинтионы и тиенопиримидины. Производные класса гидроксопиридинтионов обеспечивают аккумуляцию в клетках ионов меди, обладающих неселективным антибактериальным действием, за счет образования стабильных комплексов с Cu^{2+} , их транспорта в клетку и распада комплекса с высвобождением и накоплением Cu^{2+} в клетке в токсичных концентрациях. Производные класса тиенопиримидинов метаболизируются в клетках *M. tuberculosis* с выделением оксида азота NO и образованием метаболита с высокореактивной –SH группой, которые неселективно взаимодействуют с широким спектром биомолекул.

ВЫВОДЫ:

1. Покоящиеся «некультивируемые» клетки *M. tuberculosis* характеризуются глобальным снижением содержания мРНК и сохранением немногочисленных стабильных во времени транскриптов, значительную долю которых, помимо белок-кодирующих транскриптов, составляют малые некодирующие РНК. Для данных стабильных транскриптов покоящихся клеток предложен термин «запасенные транскрипты», отражающий их возможную роль при реактивации покоящихся форм.

2. Процесс реактивации покоящихся клеток *M. tuberculosis* на ранней стадии характеризуется «транскрипционным взрывом» – быстрой активацией транскрипции ряда генов, в том числе, кодирующих ферменты биосинтеза жирных и миколовых кислот, и ферменты репарации. На поздних этапах реверсии покоящихся форм к метаболической активности происходит активация транскрипции генов, кодирующих ферменты центральных метаболических путей.

3. Предложен новый подход для поиска соединений, эффективных против покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, учитывающий их метаболическую инертность и предусматривающий необходимость неселективного ингибирования множественных клеточных мишеней посредством необратимой химической модификации.

4. Данный подход верифицирован выявлением двух классов оригинальных соединений: гидроксипиридинтионов и тиенопиримидинов, проявляющих значительную бактерицидную активность в отношении покоящихся «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*.

5. Механизм действия производных класса гидроксипиридинтионов основан на аккумуляции в клетке *M. tuberculosis* ионов меди, обладающих неселективным антибактериальным действием, за счет образования стабильных липофильных комплексов с Cu^{2+} , их энергонезависимого транспорта в микобактериальную клетку, распадом комплексов и накоплением ионов Cu^{2+} в токсичных концентрациях, которое приводит к значительному бактерицидному эффекту, в том числе, в отношении покоящихся клеток микобактерий.

6. Механизм действия производных класса тиенопиримидинов основан на их метаболической конверсии в клетке под действием белка-активатора Rv2466с с высвобождением оксида азота NO и образованием метаболита с высокореактивной –SH группой, которые неселективно взаимодействуют с рядом ферментов и другими биомолекулами, необратимо повреждая их.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science:

1. **Salina EG**, Grigorov AS, Bychenko OS, Skvortsova YV, Mamedov IZ, Azhikina TL, Kaprelyants AS. Resuscitation of dormant "non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019, 9:272.

2. **Salina EG**, Ekins S, Makarov V. A Rapid method for estimation of the efficacy of potential antimicrobials in humans and animals by agar diffusion assay. *Chem Biol Drug Des.* 2019, 93(6):1021-1025.

3. **Salina EG**, Huszár S, Zemanová J, Keruchenko J, Riabova O, Kazakova E, Grigorov A, Azhikina T, Kaprelyants A, Mikušová K, Makarov V. Copper-related toxicity in replicating and dormant *Mycobacterium tuberculosis* caused by 1-hydroxy-5-R-pyridine-2(1H)-thiones. *Metallomics* 2018, 10(7):992-1002.

4. Kaprelyants A., **Salina EG**, Makarov V. How to kill dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriol.* 2018 7:399-400.

5. **Salina EG**, Ryabova O, Vocat A, Nikonenko B, Cole ST, Makarov V. New 1-hydroxy-2-thiopyridine derivatives active against both replicating and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Chemother.* 2017, 23(11):794-797.

6. Nikonenko BV, Kornienko A, Majorov K, Ivanov P, Kondratieva T, Korotetskaya M, Apt AS, **Salina E**, Velezheva V. *In Vitro* Activity of 3-Triazeneindoles against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016, 60(10):6422-24.

7. Ignatov DV, **Salina EG**, Fursov MV, Skvortsov TA, Azhikina TL, Kaprelyants AS. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA. *BMC Genomics* 2015,16(1):954.

8. Azhikina TL, Ignatov DV, **Salina EG**, Fursov M V, Kaprelyants AS. Role of small noncoding RNAs in bacterial metabolism. *Biochemistry (Moscow)* 2015, 80(13): 1633-1646.

9. Devi PB, Samala G, Sridevi JP, Saxena S, Alvala M, **Salina EG**, Sriram D, Yogeewari P. Structure-Guided Design of Thiazolidine Derivatives as *Mycobacterium tuberculosis* Pantothenate Synthetase Inhibitors. *ChemMedChem* 2014, 9(11):2538-47.

10. **Salina E**, Ryabova O, Kaprelyants A, Makarov V. New 2-thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58(1):55-60.

11. **Salina EG**, Waddell SJ, Hoffmann N, Rosenkrands I, Butcher PD, Kaprelyants AS. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. *Open Biol.* 2014, 4:140106.

12. Albesa-Jové D, Chiarelli LR, Makarov V, Pasca MR, Urresti S, Mori G, **Salina E**, Vocat A, Comino N, Mohorko E, Ryabova S, Pfeiffer B, Lopes Ribeiro AL, Rodrigo-Unzueta A, Tera M, Zaroni G, Buroni S, Altmann KH, Hartkoorn RC, Glockshuber R, Cole ST, Riccardi G, Guerin ME. Rv2466c mediates the activation of TP053 to kill replicating and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol*. 2014, 9(7):1567-75

13. Jeankumar VU, Chandran M, Samala G, Alvala M, Koushik PV, Yogeewari P, **Salina EG**, Sriram D. Development of 5-nitrothiazole derivatives: identification of leads against both replicative and latent *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012, 22(24):7414-17

14. **Салина ЕГ**, Жогина ЮА, Шлеева МО, Сорокоумова ГМ, Селищева АА, Капрельянц АС. Биохимические и морфологические изменения в покоящихся («некультивируемых») клетках *Mycobacterium smegmatis*. *Биохимия* 2010, 75(1):72-80

15. **Салина ЕГ**, Молленкопф Х, Кауфман С, Капрельянц АС. Изменение уровня экспрессии генов в процессе перехода клеток *Mycobacterium tuberculosis* в состояние «некультивируемости». *Acta Naturae* 2009, 2:78-83.

16. Mukamolova G, **Salina E**, Kaprelyants A. Mechanisms of latent tuberculosis: dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Vol.1, *Frontiers in Research* 2008, Humana Press, p. 83-90.

17. Трошкина ОА, **Салина ЕГ**, Сорокоумова ГМ, Капрельянц АС, Селищева АА. Влияние липосом на рост и чувствительность *Mycobacterium smegmatis* к изониазиду. *Прикладная биохимия и микробиология* 2007, 43(1):47-52.

18. Гончаренко АВ, Ершов ЮВ, **Салина Е.Г.**, Виснер И., Вострокнутова Г.Н., Санданов А.А., Капрельянц А.С., Островский Д.Н.. О роли МЭЦ (2-С-метилэритритол-2,4-циклопирофосфата) в реактивации покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis*. *Микробиология* 2007, 76(2):172-178.

Публикации в сборниках и тезисы конференций:

1. Григоров АС, **Салина ЕГ**, Быченко ОС, Скворцова ЮВ, Капрельянц АС, Ажикина ТЛ. Ресусцитация dormantной формы *Mycobacterium tuberculosis* характеризуется незамедлительным транскрипционным взрывом. *VI съезд биохимиков России*. Сочи-Дагомыс, 1-6 октября 2019, *Acta Naturae*, спецвыпуск, том 2, 2019, с. 27.

2. Grigorov A, **Salina E**, Vychenko O, Skvortsova Y, Kaprelyants A, Azhikina T. Resuscitation of dormant "non-culturable" *Mycobacterium*

tuberculosis is characterized by immediate transcriptional burst. *New approaches and Concepts in Microbiology*, Heidelberg, Germany, 10-13 July 2019, p. 176.

3. **Salina EG**, Egorova AP, Chiarelli LR, Pasca MR, Makarov VA. Thienopyrimidines kill *Mycobacterium tuberculosis* by production of nitric oxide. *FEBS OpenBio* 2019, 8(S1):239-240.

4. **Salina EG**, Makarov VA. Copper-related toxicity of 1-hydroxy-2-thiopyridines. *20th International Research Conference on Tuberculosis*, London, UK, May 14-15 2018, p. 996.

5. **Салина ЕГ**, Киарелли ЛР, Паска МР, Макаров ВА. Тиенопиримидины – новые доноры оксида азота, высокоактивные в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. *Вестник ЦНИИТ*, 2018 (4):17-22.

6. **Салина ЕГ**, Макаров ВА. Изучение механизма действия тиенопиримидинов, высокоактивных в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. *Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей*, Москва, 22-23 марта 2018, с.14.

7. **Салина ЕГ**, Макаров ВА. Механизм действия тиенопиримидинов, высокоактивных в отношении делящихся *Mycobacterium tuberculosis*. *XX международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии*, Москва, 23-25 мая 2018, с. 38.

8. **Salina EG**, Grigorov AS, Azhikina TL, Kaprelyants AS, Mikusova K, Makarov VA. New 1-hydroxy-2-thiopyridines combat *Mycobacterium tuberculosis* violating copper homeostasis. *FEBS journal* 2017, 284, p.333-334

9. **Salina EG**, Grigorov AS, Azhikina TL, Kaprelyants AS, Makarov VA. A new paradigm for killing both replicating and dormant *Mycobacterium tuberculosis* via violating copper homeostasis. *Вестник ЦНИИТ*, 2017, 1(1):64.

10. **Салина ЕГ**, Макаров ВА. Изучение механизмов действия тиенопиримидинов, высокоактивных в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. *XIX международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии*, Москва, 17-19 мая 2017, с. 35.

11. **Salina EG**, Ryabova O, Vocat A, Cole ST, Makarov VA. 1-hydroxy-2-thiopyridines kill both replicating and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *26th ECCMID*, Amsterdam, 9-12 April 2016. p. 38.

12. **Салина ЕГ**, Потапов ВД, Никоненко БН, Капрельянц АС, Макаров ВА. 1-гидрокси-2-тиопиридины проявляют высокую активность в отношении покоящихся клеток *Mycobacterium tuberculosis in vitro* и в модели хронического туберкулеза *in vivo*. *XVIII международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии*, Москва, 25-27 мая 2016, с. 38.

13. Салина ЕГ, Макаров ВА. Новые производные 2-тиопиридинов, проявляющие высокую активность в отношении растущих и покоящихся клеток *Mycobacterium tuberculosis*. XVII международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии, Москва, 20-22 мая 2015, с. 42.

14. Salina EG, Ignatov DV, Mukamolova GV, Fursov MV, Skvortsov TA, Azhikina TL, Kaprelyants AS. Non-coding RNAs may take part in regulation of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy and 'non-culturability'. *Keystone Symposium Novel Therapeutic Approaches to Tuberculosis*, Keystone, USA, 30 March-4 April 2014, p. 82.

15. EG Salina, DV Ignatov, MV Fursov, TA Skvortsov, TL Azhikina, AS Kaprelyants. Small non-coding RNAs may take part in regulation of *Mycobacterium tuberculosis* dormant "non-culturable" state. *Towards Therapies of the Future*. Moscow, 26-28 May, 2014, p.22.

16. Фурсов М.В., Салина Е.Г., Игнатов Д.В., Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л., Капрельянц А.С. Малые некодирующие РНК могут принимать участие в регуляции покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis*. *Биология – наука XXI века: 18-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых*, Пушино, 21-25 апреля 2014, с. 285-286.

17. Игнатов ДВ, Салина ЕГ, Капрельянц АС, Ажикина ТЛ. Особенности транскриптома *M. tuberculosis* в дормантном состоянии. *Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии*, Москва, 15-19 сентября 2014, с. 33.

18. Salina EG, Pasca MR, Ryabova SYu, Makarov VA. New candidates for treatment both actively and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Respirology* 2013, 18(S4):78

19. Salina EG, Pasca MR, Ryabova SY, Makarov VA. 6-nitro-2-phenylthieno[2,3-D]pyrimidines. Synthesis and activity against both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *First Russian Conference on Medicinal Chemistry*, Moscow, 9-12 September 2013, p. 137.

20. Salina E, Ryabova O, Lyubchanskaya V, Kaprelyants A. Heterylisothioureas are effective for killing of dormant 'non-culturable' *M. tuberculosis*. *Cells Tuberculosis 2012: Biology, Pathogenesis, Intervention Strategies*, Paris, 11-15 September 2012, p. 175.

21. Waddell SJ, Salina E, Hoffmann N, Rosenkrands I, Kaprelyants A., Butcher P.D. Dissecting *M.tb* adaptations to a non-culturable state and the resuscitation of growth by RNA and protein profiling. *Keystone Symposium Mycobacteria: Physiology, Metabolism and Pathogenesis – Back to the Basics*, Vancouver, Canada, 15-20 January, 2011, p. 234.