

на правах рукописи

Шлеева Маргарита Олеговна

**Особенности биохимии и физиологии
покоящихся микобактерий**

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:

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

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Габибов Александр Габирович, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, директор ИБХ РАН, лаборатория биокатализа, заведующий.

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», лаборатория бионанотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, заведующий.

Владимирский Михаил Александрович, доктор медицинских наук, профессор, НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава РФ, лаборатория иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции, заведующий.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

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

Защита состоится «8» 04 2021 г. 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 « » 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А. Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Настоящая работа посвящена изучению биохимических особенностей покоящихся форм (ПФ) микобактерий, в частности внутриклеточного патогена *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Считается, что патогенные медленнорастущие микобактерии, такие, как *Mycobacterium leprae* или *Mtb*, сохраняют жизнеспособность *in vivo* длительное время после начального заражения за счет перехода в покоящееся нерепликативное состояние (Gutti et al., 2019). Покоящиеся формы *Mtb* могут находиться в течение многих лет в организме хозяина, обуславливая латентную форму туберкулеза (ТБ). Известно, что 25 % людей Земли латентно инфицированы возбудителем ТБ (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>). Процесс реактивации заболевания зависит от индивидуальных особенностей иммунной системы носителя и от пока недостаточно изученных взаимодействий патоген-хозяин. Нет никаких гарантий, что инфекция будет оставаться в латентной форме на протяжении всей жизни носителя, так как различные факторы (прием лекарств, старение, сопутствующие заболевания и др.) могут ослабить давление иммунной системы и привести к развитию активной формы заболевания. В группе особого риска пациенты с низким иммунным статусом, зараженные ВИЧ или подвергающиеся иммуносупрессионной терапии. У ВИЧ-положительных больных риск активации латентного ТБ многократно увеличивается, достигая 8-10 % в год, что составляет миллионы случаев в год в масштабах планеты (Parrish et al., 1998). Очевидно, что проблема латентного ТБ и его реактивации имеет первостепенную важность для современной медицины. В 10-15 % случаев покоящиеся микобактерии переходят к активному делению, что приводит к активации заболевания (Lillebaek et al., 2002). Несмотря на то, что это явление было описано более 80-ти лет назад, до сих пор отсутствует ясное понимание природы латентной формы ТБ и молекулярных механизмов, посредством которых активные бактерии трансформируются в покоящиеся персистирующие формы, выживают длительное время в этом состоянии и возвращаются к активному росту. В состоянии покоя *Mtb* приобретает устойчивость ко многим известным антибактериальным препаратам и способен десятилетиями сохранять жизнеспособность в организме человека, а затем под воздействием ряда факторов переходить в состояние активного размножения, вызывая рецидив заболевания (Ehlers, 2009).

Покоящиеся персистирующие клетки (ПК) микобактерий невозможно извлечь из тканей и органов инфицированных людей поскольку их количество крайне мало, что обуславливает трудности в изучении механизмов перехода микобактерий в состояние покоя и для разработки новых подходов к борьбе с латентной формой инфекции. Отметим, что характерным свойством микобактерий при латентном носительстве является неспособность вырастать при посевах на стандартных лабораторных средах, что затрудняет их выделение. Практически единственным подходом для изучения покоящихся форм *Mtb* является создание адекватных моделей *in vitro*, наиболее близко отражающих ситуацию носительства *in vivo*.

Несмотря на многочисленные попытки получить аналоги покоящихся микобактерий (ПМ) в лабораторных условиях, до сих пор не удавалось получить *in vitro* ПМ, обладающие необходимыми свойствами, наблюдаемыми при латентном ТБ, то есть не только остановкой метаболических процессов (например, синтеза макромолекул и активного дыхания), но и способностью к многолетнему выживанию без размножения и без потери вирулентности. Логично предположить, что в клетке происходит значительная биохимическая перестройка, позволяющая длительно поддерживать жизнеспособность покоящихся форм бактерий и защищаться от воздействия стрессорных факторов. Во многих работах описаны попытки достичь перехода микобактерий в состояние покоя *in vitro* путем резкого воздействия какого-либо стрессорного фактора на активно делящиеся бактерии. Однако под таким давлением активно растущие микобактерии, очевидно, не успевают должным образом структурно перестроиться и наблюдались лишь прекращение синтетических процессов и остановка клеточного деления, при

этом биохимически клетки изменялись слабо. Наиболее удачной и простой в исполнении оказалась модель Вейна (Wayne et al., 1982), в которой в качестве стрессорного фактора для микобактерий используют ограничение по кислороду. При этом быстрое исчерпание кислорода в культуре обуславливало массовую гибель большинства клеток микобактерий, тогда как постепенное развитие гипоксии переводило микобактерии в неделяющееся состояние. Однако полученные формы микобактерий сохраняли способность к росту на плотных средах (Wayne et al., 1982). Такие формы приобретали устойчивость к некоторым антибиотикам (изониазид), но были чувствительны к действию рифампицина (ингибитору РНК-полимеразы), что свидетельствует о сохранении метаболизма как минимум на уровне синтеза РНК. Известно, что в условиях недостатка питательных веществ и кислорода, переход на альтернативный «анаэробный» тип обмена веществ является универсальным способом поддержания реакций метаболизма (Kaprelyants et al., 1993). «Клетки Вейна» не были способны к длительному выживанию при отсутствии репликации. Поскольку гипоксия не является первичным стрессовым фактором при попадании возбудителя ТБ в организм хозяина, очевидно, что необходимо искать другие факторы, индуцирующие образование ПМ.

Другие модели были основаны на лимитации питательных компонентов в среде роста. Основываясь на том, что в некротической грануле *Mtb* испытывает недостаток питательных веществ, была разработана модель голодания, в которой изначально выращенные в оптимальной среде роста микобактерии переносили в фосфатный буфер, что вызывало остановку роста бактерий, снижение активности клеточного метаболизма (Loebel et al., 1933), снижение активности дыхания и уровня экспрессии ряда генов (Betts et al., 2002). При этом в бактериальных клетках не наблюдалось существенных морфологических и биохимических перестроек, и они были способны к немедленной реактивации при наличии необходимых питательных субстратов в составе плотных сред.

Нами было обнаружено, что исключение калия из среды роста обуславливает появление «некультивируемых» форм *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) (Shleeva et al., 2004), которые были способны к реактивации только при перенесении в свежую сбалансированную среду с калием. Позже этот подход был применен для *Mtb* (Salina et al., 2014). Однако полученные в отсутствие калия формы *Mtb* не могли долго сохранять жизнеспособность без размножения, что не соответствует условиям латентного ТБ, при котором патоген способен десятилетиями сохраняться в организме хозяина без видимых признаков активации (Amberson, 1938; Flynn, 2001).

Возможно, модели остановки размножения микобактерий (в том числе модель Вейна и модель без калия) отражают начальный этап формирования «некультивируемого» покоящегося состояния *Mtb*, однако их нельзя рассматривать как модели длительно покоящихся персистирующих микобактерий. Скорее они соответствуют состоянию «выживания при голодании» («starvation survival») (Kaprelyants et al., 1993). Таким образом, вопрос о механизмах перехода микобактерий в состояние длительного покоя, а также о структурных особенностях и свойствах таких форм микобактерий, адекватных персистирующим покоящимся микобактериям *in vivo* при латентном ТБ остается открытым.

Проанализируем условия, в которых образуются и выживают персистирующие покоящиеся формы *Mtb* в организме хозяина. При первичном заражении бактерии поглощаются в основном альвеолярными макрофагами, которые служат основной нишей для их роста в этот период. В этих условиях на клетки *Mtb* действуют такие стрессорные факторы, как оксид азота, гидролитические ферменты лизосом, активные формы кислорода и низкие значения pH. Клетки *Mtb* способны адаптироваться к неблагоприятным условиям внутри макрофага, а именно, к воздействию слабокислых значений pH (5.8 - 6.5) (Biketov et al., 2000). На более поздних сроках заражения наблюдается формирование гранул, представляющих собой некротическое ядро,

возникшее вследствие казеозного некроза фагоцитов, вокруг которого находится смесь лимфоцитов, активированных макрофагов и фибробластов (Russell, 2007; Saunders and Britton, 2007). Из-за плохой перфузии внутренность гранулемы становится гипоксической. Несмотря на активность иммунной системы хозяина, какое-то количество клеток возбудителя туберкулеза избегает гибели, в частности, из-за затрудненного доступа клеток хозяина во внутренние слои гранулемы. Мы предположили, что триггерный фактор, индуцирующий процесс перехода микобактерий в состояние покоя, нужно искать среди первичных стрессорных воздействий, появляющихся на пути патогена в организме хозяина.

Основываясь на том, что снижение pH является основным фактором, ограничивающим рост *Mtb* в макрофагах (Welin et al., 2011), и одним из первых стрессорных воздействий, с которым сталкивается патоген при попадании в организм хозяина, можно ожидать формирование покоящихся форм микобактерий в условиях стационарной фазы культур *Mtb* при постепенном снижении значения pH среды. Это предположение нуждалось в экспериментальной проверке, что и являлось одной из задач данного исследования. Необходимым условием было получение ПМ в количествах, достаточных для изучения их биохимических характеристик, включая анализ протеома, для объяснения механизмов поддержания жизнеспособности микобактерий в длительном состоянии покоя и выхода из него с реверсией ростовых процессов.

Вторая важная сторона проблемы латентного ТБ – это выявление причин и механизмов реактивации ПМ и перехода к активной форме заболевания.

Несмотря на то, что явление активации латентного ТБ известно уже много лет, механизм этого процесса до сих пор неясен. Ранее было обнаружено семейство секретируемых белков Rpf (resuscitation promoting factors), которые участвуют в процессе реактивации «некультивируемых» покоящихся клеток сапрофитной бактерии *Micrococcus luteus* (Kaprelyants et al., 1996; Mukamolova et al., 1998). Гены этих белков были обнаружены также в геноме микобактерий. Было продемонстрировано, что Rpf является пептидогликангидролазой и способен гидролизовать гликозидную связь между N-ацетил глюкозамином и N-ацетил мурамовой кислотой в пептидогликане, входящем в состав клеточной стенки бактерий (Cohen-Gonsaud et al., 2005). Но, каким образом эта активность связана с реактивацией, было не ясно. Также выяснилось, что Rpf-индуцируемый механизм реактивации *in vivo* зависит от наличия в популяции покоящихся форм некоторого количества метаболически активных бактерий, в которых начинается синтез белка Rpf. Это условие трудно выполнимо в реальной ситуации, поскольку количество ПМ в организме животного или человека при латентном ТБ может быть очень низким. Можно предположить, что начало процесса реактивации связано с более простыми, чем Rpf, индукторами - продуктами метаболизма микобактерий или организма хозяина. Так как возбудитель ТБ может использовать липиды хозяина в качестве источника углерода (Miner et al., 2009), поиск инициаторов реактивации ПМ можно вести среди веществ липидной природы. Также практически не известно какие биохимические процессы происходят в ПМ после индукции их перехода в активное состояние.

В связи с вышеизложенным можно заключить, что понимание механизмов перехода микобактерий в состояние покоя и возвращения к активному делению требует новых подходов, включающих, прежде всего, разработку соответствующих моделей *in vitro*, имитирующих длительную персистенцию микобактерий *in vivo*, а также изучение биохимических особенностей процессов перехода микобактерий в покой и выхода из него. Полученные знания могут быть использованы для поиска новых, эффективных решений проблемы латентного ТБ, включающих разработку новых методов диагностики этого вида инфекции и новых способов борьбы с возбудителем этого заболевания.

Цель и задачи работы. Целью данного исследования являлось получение *in vitro* покоящихся микобактерий, сохраняющих потенциал к реактивации в течение длительного времени (1 год и

более), и их биохимическая характеристика, включающая выявление факторов сохранения жизнеспособности микобактерий в состоянии покоя, а также установление механизма реактивации из этого состояния.

Поскольку *Mtb* является медленно растущей *in vitro* бактерией, некоторые исследования проводили с использованием быстрорастущей непатогенной родственной бактерии – *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*) для выявления механизмов адаптации к покою и обнаружению общих механизмов с патогеном *Mtb*.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать подходы, позволяющие получить длительно выживающие (не меньше 1 года) в состоянии обратимого покоя и «некультивируемости» формы *M. smegmatis* и *M. tuberculosis in vitro*, обладающие свойствами, максимально приближенными к персистирующим микобактериям в ситуации *in vivo*. Оценить инфекционный потенциал полученных форм в экспериментах с животными.
2. Биохимическая и микробиологическая характеристика микобактерий, находящихся в состоянии длительного покоя.
3. Выявить факторы, обеспечивающие сохранение жизнеспособности покоящихся микобактерий в условиях длительного отсутствия деления.
4. Провести поиск инициаторов реактивации микобактерий из состояния покоя и изучить механизмы их действия.
5. Охарактеризовать биохимические процессы, происходящие при реактивации микобактерий из состояния покоя.

Научная новизна работы.

- Впервые разработана модель *in vitro* образования длительно выживающих покоящихся микобактерий *Msm*, *Mtb* и *Corynebacterium jeikeium* на основе их адаптации к условиям плавного понижения pH внешней среды с последующим хранением культур в микроаэрофильных условиях, имитирующая условия, возникающие в макрофагах при захвате микобактерий. Покоящиеся микобактерии обладают существенно сниженной активностью метаболизма, овоидной формой клеток, утолщенной клеточной стенкой, устойчивостью к воздействию антибиотиков/стрессорных факторов, а также способностью сохраняться без размножения в жидких средах длительное время без существенной потери жизнеспособности.

- Впервые выявлены три стадии глубины покоя микобактерий, определяемые по скорости реактивации и отражающие уровень снижения метаболической активности, развитие «некультивируемости» и способности ПМ к реактивации.

- Установлено, что мыши, инфицированные полученными *in vitro* в условиях pH-индукции покоящимися «некультивируемыми» формами *Mtb*, проявляли симптомы, характерные для хронического/латентного ТБ. Через 18 месяцев после заражения у мышей развивалась активная форма ТБ. Разработанная модель носительства ТБ *in vivo* у животных является пока единственной для изучения латентной формы ТБ.

- Обнаружено, что покоящиеся клетки микобактерий аналогично экзоспорам стрептомицетов и спорам аскомицетовых дрожжей способны накапливать большие количества трегалозы в процессе перехода в состояние покоя и расходовать ее при реактивации.

- Впервые охарактеризован протеомный профиль микобактерий, находящихся в состоянии длительного покоя и «некультивируемости». Показано, что в период длительного выживания в неблагоприятных для роста условиях в покоящихся микобактериях содержится значительное разнообразие сохраненных белков, значительная часть (45 %) которых не выявляется в протеоме активно размножающихся микобактерий. Обнаружены некоторые ферменты центрального метаболизма (гликолиз, цикл Кребса), сохраняющие потенциальную активность, а

также большое число белков, участвующих в защите бактериальной клетки от действия стрессорных факторов.

- Впервые установлено, что фосфолипиды и свободные ненасыщенные жирные кислоты (СНЖК) в низких концентрациях могут индуцировать реактивацию ПМ; выявлена роль аденилатциклаз MSMEG_4279 и Rv2212, а также транскрипционного фактора Rv3676, зависящего от цАМФ, как в процессе реактивации микобактерий в присутствии СНЖК, так и стимулировании роста микобактерий. Установлено, что СНЖК активируют цАМФ-зависимый синтез белка RpfA. В результате ферментативной активности белков Rpf и RipA образуются фрагменты пептидогликана (мунопептиды), стимулирующие реактивацию ПМ.

- Продемонстрировано, что нитрофенилтиоцианаты ингибируют энзиматическую активность белков Rpf и способны подавлять реактивацию ПМ из «некультивируемого» состояния *in vitro* и *in vivo*.

- Обнаружено, что процесс реактивации ПМ включает несколько стадий: истинная лаг-фаза, включающая гидролиз трегалозы; метаболическая реактивация, включающая начало биосинтетических процессов и начальная стадия деления клеток.

- Обнаружено, что ПМ содержат существенное количество свободных порфиринов, по-видимому, накапливающихся вследствие блокирования терминальных реакций синтеза гема. Установлено, что ПМ, содержащие эндогенные порфирины, могут быть фотоинaktivированы с помощью света.

- Обнаружено, что полидиаллиламины обладают бактерицидным действием как на активные, так и на покоящиеся микобактерии, благодаря их способности связываться с мембранами бактерий и формировать комплексы с нуклеиновыми кислотами.

Практическая значимость работы. Предложенные модели образования «некультивируемых» покоящихся клеток микобактерий *in vitro* и *in vivo*, имитирующие состояние патогена в период латентного ТБ, являются новым инструментом для изучения механизмов образования и реактивации длительно выживающих и сохраняющих вирулентность покоящихся форм возбудителя ТБ, а также изучения путей метаболизма, вовлеченных в процесс перехода микобактерий в покоящееся состояние и выхода из него. Разработанные модели могут быть использованы для выявления особенностей взаимодействия иммунной системы хозяина и ПМ в период латентной инфекции. Созданная модель хронического/латентного ТБ *in vivo* на животных может быть применена для исследования ответа иммунной системы хозяина на эту форму возбудителя туберкулеза.

Полученные покоящиеся клетки микобактерий могут быть использованы для разработки и тестирования новых методов и антибактериальных средств, эффективных в отношении как покоящихся, так и реактивирующихся микобактерий, персистирующих в организме хозяина. Полученные в ходе работы результаты могут быть использованы для разработки новых методов диагностики латентного ТБ и борьбы с этой формой инфекции, в частности, методов дезинфекции и фотодинамической инактивации микобактерий. Белки, обнаруженные при анализе протеомного профиля покоящихся форм *Mtb* могут быть использованы для выявления потенциальных мишеней для создания противотуберкулезных препаратов, а также для разработки новых подходов к диагностике латентного туберкулеза.

Личный вклад соискателя заключался в планировании и проведении исследований, разработке новых экспериментальных подходов, анализе полученных результатов, подготовке материала к публикациям. В работах, выполненных в соавторстве, вклад соискателя состоял в непосредственном участии в определенных или всех этапах исследования – от постановки задач и проведения экспериментов до обсуждения полученных данных и подготовки их к опубликованию.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: IV съезд микробиологов Узбекистана, Ташкент, 2008; IV международная молодежная школа-конференция, Москва, 2008; 3-й Европейский конгресс микробиологов (FEMS), Гётеборг, Швеция, 2009; Конференция Европейского общества молекулярных биологов (EMBO), Барселона, Испания, 2010; 3-я Конференция Европейского общества молекулярных биологов (EMBO), Вена, Австрия, 2011; 18-ой международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых (г. Пушкино, 2014); VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – BioMicroWorld 2015 (Барселона, Испания, 2015); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2016», (Москва, 2016); EMBO Conference Tuberculosis 2016 (Париж, Франция, 2016); Keystone Symposia Conference (Vancouver, Canada, 2017); 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); 1-й Российский Микробиологический Конгресс (Пушино, Россия, 2017); 43rd FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018); 44rd FEBS Congress (Краков, Польша, 2019); VI Съезд биофизиков России (Сочи, Россия, 2019).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 46 работ, в том числе 25 статей в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, и 20 тезисов в материалах конференций. Получен 1 патент на изобретение.

Место проведения работы. Работа *in vitro* проводилась в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Работы *in vivo* были проведены в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза РАН.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, списка цитируемой литературы (401 ссылка), 2-х приложений. Работа изложена на 409 страницах машинописного текста, содержит 108 рисунков и 14 таблиц.

Сокращения, принятые в тексте. КОЕ – колониеобразующие единицы; НВЧК– наиболее вероятное число клеток; OP_{600} – оптическая плотность при длине волны 600 нм; МКР – метод конечных разведений; НК – «некультивируемые» клетки, состояние; ПМ – покоящиеся микобактерии; ПФ – покоящиеся формы бактерий; Rpf – фактор, способствующий реактивации ПФ бактерий (от Resuscitation promoting factor); *Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*; *Msm* – *Mycobacterium smegmatis*; PI – йодид пропидия, флуоресцентный краситель, детектирующий поврежденные клетки; СНЖК - свободные ненасыщенные жирные кислоты; цАМФ - циклический аденозинмонофосфат; ТБ – туберкулез; АЦ – аденилатциклаза; НФТ – нитрофенилтиоцианаты; ФПГ – фрагменты пептидогликана; ПГ – пептидогликан; ангидроГМДП - N-ацетилглюкозаминил- $\beta(1\rightarrow4)$ -N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат; ФДИ – фотодинамическая инактивация; ФС – фотосенсибилизатор; АЛК – 5-аминолевуленовая кислота; АФК – активные формы кислорода.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Как патогенная микобактерия *M. tuberculosis*, так и непатогенная *M. smegmatis* в условиях плавного закисления ростовой среды *in vitro* в пост-стационарной фазе роста культур способны формировать покоящиеся морфологически измененные «некультивируемые» клетки, устойчивые к антибиотикам и способные к длительному выживанию в состоянии покоя, а также к реактивации и реверсии ростовых процессов.
2. Полученные *in vitro* покоящиеся «некультивируемые» формы *M. tuberculosis* при заражении ими мышей способны вызывать инфекцию *in vivo*, сходную по характеристикам с латентным туберкулезом и его реактивацией.
3. Микобактерии в состоянии длительного покоя содержат значительное количество и разнообразие белков и потенциально активных ферментов, которые могут обеспечивать их устойчивость к повреждающим воздействиям и поддержание жизнеспособности в период покоя.

4. В покоящихся микобактериях значительно повышается уровень свободных порфиринов, что обуславливает фоточувствительность бактерий и возможность их фотоинактивации.
5. Поддержание длительного состояния покоя клеток *M. smegmatis* зависит от внутриклеточной концентрации трегалозы, известного стабилизатора биомолекул. Особенности обмена трегалозы позволяют выявить общности механизмов покоя у микобактерий и экзоспор стрептомицетов и аскомицетовых дрожжей.
6. Реактивация микобактерий и реверсия ростовых процессов включают несколько стадий: начальную, связанную с активацией трегалазы и гидролизом трегалозы; метаболическую реактивацию, начинающуюся с синтеза цАМФ, и последующую активацию метаболических реакций и биосинтетических процессов, обеспечивающих начало клеточного деления.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы дана характеристика явления покоя неспорообразующих бактерий, в том числе микобактерий, как процесса, лежащего в основе латентной формы туберкулеза. В связи с этим подробно анализируются предлагаемые модели покоящегося состояния микобактерий *in vitro*. Обсуждаются стрессовые факторы и возможные стратегии выживания *Mtb* в организме хозяина, а также некоторые особенности покоящегося состояния и процесса выхода из него. Делается акцент на особенностях биохимии возбудителя туберкулеза в период нерепликативного состояния в условиях стресса. Рассматриваются адаптивные механизмы выживания *Mtb* внутри макрофагов хозяина при первичном заражении.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Микроорганизмы и условия культивирования. В качестве объектов исследования использовали штаммы *M. smegmatis* mc²155 (*Msm*) и *M. tuberculosis* H37Rv (*Mtb*), а также ряд мутантных штаммов (табл. 1).

Msm. Инокулят *Msm* выращивали в питательной среде (NB) («Himedia», Индия) при 37°C в течение 24 ч с перемешиванием (200 об/мин). Для получения покоящихся форм инокулят (1 мл) вносили в 100 мл среды Сотона. Для предотвращения агрегации клеток добавляли Твин-80 (конечная концентрация 0.05%). Культуру выращивали при 37°C на качалке (200 об/мин) в течение 13–16 сут, пока после фазы защелачивания не установится значение pH среды ~ 6.0. Затем продолжали инкубирование культуру статически при комнатной температуре в закрытых 50-мл-х пробирках в течение года и более.

В отдельных экспериментах (для скрининга стимуляторов размножения и выявления роли цАМФ) для получения «некультивируемых» форм клетки *Msm* выращивали в среде, не содержащей ионы калия (Shleeva, 2004). Для выращивания штаммов *Msm*, содержащих плазмиды, в среды культивирования вносили гигромицин (50 мкг/мл) или канамицин (10 мкг/мл).

Mtb. Культуры *Mtb* выращивали 8-11 сут при 37°C с перемешиванием (200 об/мин) в колбах объемом 100 мл, содержащих 40 мл синтетической среды Сотона и 0.05% раствора Твин-80 с внесением ростовой добавки ADC (Himedia, Индия). Эти бактериальные культуры использовали для инокуляции в модифицированную среду Сотона (мСотон) для получения покоящихся форм *Mtb*. Модификация среды Сотона заключалась в замене глицерина на глюкозу, замене Tween-80 на 0.025% тилоксапол и замене ADC на 0.5% BCA («Sigma», США). Начальные значения pH в модифицированных средах составляли 6.2, что отличалось от pH 7.0 в стандартной среде Сотона. Культуры инкубировали в течение 40-60 сут, при 37°C с перемешиванием. Когда после фазы защелачивания среды, значение pH достигало 6.0-6.2, культуры переносили в плотно закрывающиеся пластиковые 50-мл-е пробирки и добавляли 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС) до конечной концентрации 20 мМ для предотвращения дальнейшего снижения pH среды при длительном хранении. Инкубацию продолжали в статических условиях в течение 365 сут (и более) при комнатной температуре в темноте. Периодически отбирали образцы для оценки жизнеспособности бактерий методами определения числа КОЕ и проведения биохимических и микробиологических экспериментов.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды микроорганизмов, использованные в работе

Сокращенное название штамма	Краткое описание	Источник
<i>Msm</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
<i>Mtb</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
<i>C. jeikeium</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
ΔАЦ	Мутант <i>Msm</i> с делетированным геном MSMEG_4279	получен в работе
ΔАЦ + pMindАЦ	штамм ΔАЦ с делетированным геном MSMEG_4279, трансформированный плазмидой pMindАЦ, несущей ген MSMEG_4279	получен в работе
ΔАЦ + pAGR	штамм ΔАЦ с делетированным геном MSMEG_4279, трансформированный плазмидой pAGR, несущей ген <i>rpf</i>	получен в работе
pMind	Плаزمида устойчивости к канамицину и гиргромацину	Blokpoel <i>et al.</i> , 2005
pAGH	Плазмида устойчивости к канамицину и гиргромацину	Mukamolova <i>et al.</i> , 2002
pAGR	Дериват pAGH, несущий ген <i>rpf</i>	Shleeva <i>et al.</i> , 2004
pMindАЦ	штамм <i>Msm</i> , трансформированный плазмидой pMindАЦ, несущей ген MSMEG_4279	получен в работе
pES_MSMEG_4535	штамм <i>Msm</i> , трансформированный плазмидой pES_MSMEG_4535, несущей ген трегалазы MSMEG_4535	получен в работе
pMindRv2212	штамм <i>Mtb</i> , трансформированный плазмидой pMindRv2212, несущей ген аденилатциклазы Rv2212	получен в работе
pMindRv3676	штамм <i>Mtb</i> , трансформированный плазмидой pMindRv3676, несущей ген транскрипционного фактора Rv3676	получен в работе

Оценка жизнеспособности микобактерий. Численность КОЕ определяли при посеве десятикратных разведений культур на агаровых средах NB («Himedia», India) (для *Msm*) или Сотона с добавлением ростовой добавки ADC (Himedia, Индия) (для *Mtb*). Чашки Петри инкубировали при 37 ° С в течение 5 (для *Msm*) или 21 (для *Mtb*) сут, затем подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Предел обнаружения составил 10 КОЕ / мл.

Определение метаболической активности клеток проводили методом мониторинга включения ³[Н]—урацила при измерении радиоактивности на сцинтилляционном счетчике LS6500 («Beckman», США).

Реактивация «некультивируемых» (НК) клеток. Реактивацию проводили в свежих жидких средах с добавлением различных индукторов (липидов, цАМФ, белков, муропептидов), а также в присутствии супернатанта, полученного из активно-растущих культур микобактерий, оценивая число реактивированных клеток (НВЧК) методом конечных разведений (МКР) в жидкой среде.

Экстракция пигментов и трегалозы из клеток. Пигменты и трегалозу экстрагировали из биомассы бактерий (0.8 г) по методу Блая и Дайера смесью хлороформа (1.0 мл) и метанола (2.0 мл). После перемешивания (2 ч), клетки отделяли центрифугированием (2500 g, 20 мин) и к супернатанту добавляли 1.0 мл воды и 1.0 мл хлороформа (для разделения фаз). Слой хлороформа, содержащий пигмент анализировали методом ВЭЖХ (Аквилон, «Стайер», Россия). Водно-метанольный слой содержал трегалозу.

Определение порфирина методом ВЭЖХ. Пигменты, содержащиеся в хлороформных экстрактах, анализировали методом ВЭЖХ с использованием колонки (4.6x250 мм) с сорбентом Kromasil 100-5 C18 («Akzo Nobel», Швеция); в градиентном режиме с буфером А (30%-ный водный CH₃CN) и буфером В (100% CH₃CN) при скорости потока 1 мл/мин и объеме образца 50 мкл. Копропорфирин III и протопорфирин IX (Calbiochem, США) были использованы в качестве стандартов. Длина волны регистрации – 400 нм.

Определение сахаров методом ВЭЖХ. Десять мкл водно-метанольного слоя наносили на колонку Zorbax (4,6 мм × 150 мм) (Agilent, США) и регистрировали с помощью ВЭЖХ-хроматографии Aquilon (Россия) оснащенного рефрактометрическим детектором. Подвижная фаза представляла собой ацетонитрил: вода (70:30), скорость потока составляла 1 мл в мин. Коммерческие трегалоза и глюкоза были использованы в качестве стандартов.

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Спектры ЯМР в препаратах очищенных пигментов и трегалозы, растворенных в дейтерированном метаноле или воде, регистрировали на спектрометре Varian NA-100 D (рабочая частота спектрометра 100 мгГц). Для калибровки амплитудных интенсивностей пиков использовали внешний эталонный образец раствора гексаметилдисилоксана (ГМДС) в четыреххлористом углероде в отношении 1:50. Химические сдвиги в спектрах ЯМР измеряли от линии H₂O и пересчитывали на ГМДС.

Фотодинамическая инактивация. Для экспериментов по инаktivации клеток светом использовали суспензии микобактерий с ОП = 0.1, что соответствовало ~ 10⁷ кл/мл. В лунки 96-луночного планшета Nunc («ThermoFisher Scientific», США) вносили по 100 мкл суспензий бактерий. Образцы освещали светом с длиной волны 395 нм, 532 нм, 565 нм, 575 нм и 650 нм в течение 5, 15, 30 или 60 мин. Плотность мощности света определяли с помощью измерителя мощности 2936-с («Newport», США). Температурный контроль осуществлялся с помощью мультиметрического термомпарного датчика 80BK типа К («Fluke», Германия) непосредственно в микроячейке до и после освещения, а также в присутствии и без суспензии бактерий с точностью ± 0.2°C. Температура в лунках была ниже 40°C в течение всех экспериментов.

Микроскопия. Фазово-контрастную эпифлуоресцентную микроскопию осуществляли с использованием Ni-U-микроскопа Eclipse («Nikon», Япония). Эпифлуоресцентную микроскопию проводили в канале «TRITC» (Ex = 540/25; DM = 565; BA = 605/55).

Измерения времени жизни флуоресценции порфиринов проводили с использованием конфокального микроскопа с пикосекундным временным разрешением MicroTime 200 (Pico-Quant GmbH, Берлин, Германия). Для получения изображения использовался апохроматический объектив с высокой числовой апертурой (U Apo N × 100X, NA 1,49, масляная имерсия, Olympus), для возбуждения флуоресценции порфиринов в полосе Сорэ при 405 нм использовали импульсный лазер LDH-P-C-405B (Pico-Quant GmbH, Берлин, Германия).

Определение внутриклеточного уровня АТФ и цАМФ. Для получения клеточных экстрактов клетки микобактерий, осажденные центрифугированием (3000 g, 15 мин), суспендировали в небольшом объеме ДМСО (0.5 мл) и разрушали в дезинтеграторе BeadBeater («BioSpec Products», США). Неразрушенные клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 20 мин). Содержание АТФ в клеточном экстракте измеряли по интенсивности биолюминесценции люциферин/люциферазы на люцинометре ЛЮМ-1. Для измерения цАМФ к осадку клеток, полученному после центрифугирования культуры при 13 000 g 5 минут, добавляли 1 мл 0.1N HCl и нагревали при 95 °C в течение 5-10 минут, а затем немедленно охлаждали во льду. Клетки разрушали на гомогенизаторе FastPrep-24, удаляли фрагменты клеток центрифугированием (5000 g, 15 минут), в супернатанте измеряли уровень цАМФ методом конкурентной ELISA в плашках, в лунки которых последовательно добавляли кроличьи антитела к цАМФ (1:5000) (GenScript, USA), затем конъюгат пероксидазы с цАМФ (1:20000) (GenScript, USA) и субстрат для пероксидазы. Яркость окрашивания регистрировали на спектрофотометре для плашек Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Austria) при 450 nm.

Оценка инфекционного потенциала микобактерий в опытах *in vivo*. Мышей инбредных линий I/StSnEgYCit (I/St) и C57BL/6JCit (B6) выращивали и поддерживали в стандартных условиях в виварии Центрального института туберкулеза (международный код - CIT) в соответствии с приказом Министерства здравоохранения России № 755, а также в соответствии с сертификатом № A5502-11 OLAW, NIH. Вода и корм давались *ad libitum*. Были использованы самки в возрасте 8-12 нед. Все экспериментальные процедуры были одобрены комитетом по этике (IACUC) ФГБНУ

«ЦНИИТ». Мышей инфицировали внутривенно (для оценки вирулентности мутантных штаммов *Mtb*) в дозе 5×10^6 бактерий на мышь в 0.5 мл стерильного PBS или внутритрахеально (для выявления инфекционного потенциала покоящихся клеток *Mtb*) в дозе 10^5 бактерий на мышь в 0.05 мл стерильного PBS. Для оценки количества микобактерий в легких, периодически после заражения, гомогенаты (0.2 мл) органов, полученных индивидуально от 4-5 мышей в каждой группе, высевали на агар Дюбо с последовательными 10-кратными разведениями, и после 21-23 сут инкубации при 37°C подсчитывали число колоний.

Протеомный анализ клеток микобактерий был выполнен с помощью фракционирования белков посредством двумерного электрофореза и последующим их определением с помощью MALDI-TOF и программы MASCOT.

Активности ферментов оценивали в грубом экстракте активных и покоящихся микобактерий стандартными спектрофотометрическими методами.

Активность трегалазы измеряли путем оценки высвобождающейся глюкозы с использованием глюкозооксидазного метода (Green et al., 1989).

Штаммы микобактерий с гиперэкспрессией целевых генов получали на основе вектора pMind.

Штамм *Msm* с делецией гена MSMEG-4279 был получен методом аллельного обмена.

Получение рекомбинантных белков Rpf и RipA. Выделение и очистку белков проводили с использованием металлохелатной хроматографии. Чистоту рекомбинантных белков оценивали электрофорезом в 12% полиакриламидном геле и иммуоблоттом с анти-His-Tag антителами, подтверждали методом MALDI.

Выделение и очистка РНК. Клетки *Msm*, осажденные центрифугированием (10 мин, 5000 об/мин), ресуспендировали в 1 мл тризола («Invitrogen», Великобритания) и разрушали в присутствии циркониевых бус диаметром 0,1 мм на дезинтеграторе BeadBeater («BioSpec Products», США) дважды в течение 30 с при максимальной скорости. Далее бусы осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин), экстрагировали РНК хлороформом, осаждали изопропанолом, отмывали 70% этанолом и растворяли в воде, не содержащей нуклеиновых кислот. Образцы дважды обрабатывали ДНКазой Turbo DNase (Life Technologies, США) и очищали, используя набор RNeasy mini kit (Qiagen, Netherlands), согласно протоколу производителя.

ПЦР в реальном времени. Для синтеза кДНК использовали праймеры для каждого из четырех Rpf-подобных генов *Msm*. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор фирмы Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix Sample. Реакции проводили согласно протоколу Bio-Rad в приборе «MiniOpticon Real-time PCR System» (Bio-Rad). Для оценки экспрессии генов синтеза трегалазы один микрограмм РНК использовали для синтеза кДНК со случайными гексануклеотидами и обратной транскриптазой SuperScript III (Life Technologies). Количественный ПЦР анализ проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия) и системы ПЦР в реальном времени LightCycler 480 (Roche, Швейцария).

Муралитическая активность белков Rpf оценивалась по гидролизу искусственного флюорогенного субстрата (аналога клеточной стенки) - 4-метилумбеллиферил-β-d-N,N',N''-ацетилглюкозамина (4-MUF-3-NAG) ("Sigma", Германия). Интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью флуориметра RF-5301PC («SHIMADZU», Япония), используя длину волны возбуждения 364 нм и испускания 448 нм. Эксперимент проводился при 20°C. Ингибиторы (НФТ) использовали в виде раствора ацетонитрила (1 мг / мл).

Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF анализ) пигмента и муропептидов.

Подготовка образцов: 1,5 мкл образца смешивали с 0,5 мкл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich; раствор 10 мг мл⁻¹ в 20% ацетонитриле, добавляли 0,5% трифторуксусной кислоты (TFA)) на подложке MALDI. Смеси давали высохнуть на воздухе. Масс-спектры регистрировали на спектрометре MALDI-TOF ultrafleXtreme (Bruker, Германия), оборудованном Nd-УФ-лазером в режиме ионизации с положительным рефлектроном. Точность измерения составила 70 ppm. Для спектров фрагментации использовался тандемный режим с оптимизированной мощностью лазера (100 Гц).

Статистическую обработку проводили с помощью анализа среднеквадратичного отклонения внутри группы данных, вычисления корреляции двух групп данных, *t*-теста

Стьюдента, ANOVA. Для достоверной разницы использовали критерий вероятности $P < 0,05$. Эксперименты повторяли 3-10 раз.

Глава 3. Основные результаты и их обсуждение

3.1. Создание моделей покоящихся форм микобактерий *in vitro*, имитирующих свойства патогена в период латентной формы туберкулеза

Известно, что в зараженных микобактериями макрофагах значение pH фагоцитарных вакуолей стабилизируется на уровне 5.8 – 6.5 (Sturgul-Koszycki, 1994; Xu, 1994, Upadhyay, 2018), что рассматривается как основной фактор, ограничивающий рост клеток возбудителя туберкулеза в макрофагах (Welin et al., 2011). Исходя из этого можно было ожидать перехода микобактерий в состояние покоя в условиях постепенного снижения значения pH среды в стационарной фазе развития культуры и дальнейшего длительного выдерживания в микроаэрофильных условиях.

В качестве модельного организма использовали быстрорастущего непатогенного родственника возбудителя ТБ – *M. smegmatis* (*Msm*), который довольно распространен в природных экосистемах. Отработанные на нем подходы и условия адаптировали применительно к медленно растущему возбудителю ТБ – *M. tuberculosis* (*Mtb*).

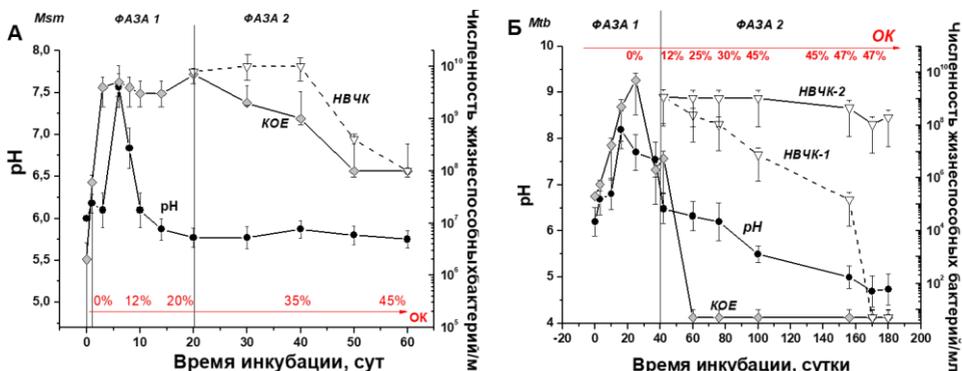


Рис. 1. Образование «некультивируемых» оvoidных клеток *Msm* (А) и *Mtb* (Б) при постепенном снижении pH среды в стационарной фазе. Шкала ОК – прирост доли клеток с измененной морфологией, ОК – оvoidные клетки. Фаза-1 – инкубация на качалке при 37°C, Фаза-2 – инкубация при комнатной температуре без перемешивания. НВЧК-1 – количество жизнеспособных клеток, оцененное с помощью МКР в свежей жидкой среде; НВЧК-2 – количество жизнеспособных клеток, оцененное с помощью МКР с использованием супернатанта активных культур.

В период активного роста культур микобактерий, происходит потребление аспарагина, содержащегося в среде Сотона, с образованием аспартата (благодаря активности аспарагиназы) и накоплением в среде роста ионов аммония, вследствие чего увеличивались значения pH среды (рис.1А, Б). При дальнейшем инкубировании и переходе культуры в стационарную фазу роста в культуральной жидкости наблюдалось накопление органических кислот за счет метаболизма глицерина, что приводило к плавному понижению значений pH в среде до 5.8-5.7 в течение 7-14 сут для *Msm* (рис. 1А) и 30-45 сут для *Mtb* (рис. 1Б).

Стадии развития культур	Вегетативный рост 1	Начальная стадия покоя 2	Глубокий покой 3
Фазово-контрастная микроскопия Длина масштабной метки <u>2 мкм</u> <i>M. smegmatis</i>			
Электронная микроскопия тонких срезов <i>M. smegmatis</i> <i>M. tuberculosis</i> Длина масштабной метки <u>2 мкм</u>	 Г Ж	 Д З	 е И
Атомно-силовая микроскопия клеток <i>M. smegmatis</i>			

Рис. 2. Вид микобактерий при фазово-контрастной микроскопии (а, б, в для *Msm*), электронной микроскопии (г, д, е для *Msm* и ж, з, и для *Mtb*) и атомно-силовой микроскопии (к, л для *Msm*). 1 – клетки логарифмической фазы роста (2 сут. культивирования для *Msm* и 10 суток для *Mtb*), 2 – переходные формы (20 сут. для *Msm* и 40 сут. для *Mtb*), 3 – покоящиеся клетки микобактерий (60 сут.). Длина масштабной метки: (а-и) – 2 мкм.

При анализе методом ВЭЖХ в культуральной жидкости с низкими значениями pH были обнаружены производные органических кислот, в том числе входящих в цикл Кребса (лактата, ацетата, сукцината, цитрата, фумарата и пирувата) в количествах, достаточных для закисления среды. Одновременно со снижением pH среды в пост-стационарной фазе (7-9 суток для *Msm* и после 40 суток для *Mtb*) наблюдалось появление морфологически измененных клеток микобактерий (рис. 1, 2). Эти клетки характеризовались овоидной формой, утолщенной слоистой клеточной стенкой и электронноплотной цитоплазмой (рис. 2 Г-И). Согласно данным атомно-силовой микроскопии (рис. 2Ж, 2з), размеры активно размножающихся клеток (3.7×0.8 мкм) были больше размеров клеток с измененной морфологией (1.2×0.9 мкм) (рис. 2). Степень

снижения значения рН (Δ рН) культуры влияла на количество образующихся овоидных клеток бактерий. Подобные формы *Mtb* с овоидной и коккоидной морфологией ранее были изолированы из инфицированных тканей животных (Khomenko, 1984). Высокая доля морфологически измененных клеток *Msm* (35 % овоидных форм и 30% переходных форм) была зафиксирована при плавном снижении значения рН в культуре на 2.5 - 3 единицы. При этом на стандартной среде Сотона с исходным значением рН 7.0 (S7) количество овоидных клеток к 14 сут инкубирования составило только 10-15%, а значение рН в стационарной фазе уменьшалось всего на 1.2 единицы. При стабилизации значений рН путем внесения 50 мМ MOPS (Δ рН всего 0.4) клетки овоидной формы практически отсутствовали.

Таким образом и степень, и скорость снижения рН культуры в стационарной фазе влияют на формирование овоидных клеток *Msm*. Отметим, что способность клеток пост-стационарных культур *Msm* и *Mtb* расти на плотных средах (КОЕ/мл) менялась синхронно с изменением рН среды роста (рис. 1А, 1Б). В условиях длительного хранения при комнатной температуре в культурах *Msm* при рН среды 6.1-5.8 наблюдали снижение численности КОЕ на 1.5 порядка (до 10^8 КОЕ/мл) через 60 сут инкубации (рис. 1А) и до 10^4 - 10^5 КОЕ/мл через 1 год инкубации. При этом, численность жизнеспособных клеток в 30-60 сут популяциях *Msm*, оцененная методом наиболее вероятной численности клеток (НВЧК) составила 5×10^8 - 10^{10} кл/мл и оказалась на 1 - 2 порядка выше титра колониеобразующих клеток (КОЕ) (рис. 1А). Отсутствие овоидных клеток с поврежденным барьером проницаемости мембраны в длительно инкубируемых культурах *Mtb* свидетельствовало о сохранении их потенциальной жизнеспособности, несмотря на наблюдаемое резкое снижение числа КОЕ (рис. 1Б). Аналогично *Msm*, 60-суточные культуры *Mtb* с КОЕ = 0, содержащие овоидные формы, были способны восстанавливать рост при культивировании в жидкой среде Сотона ("спонтанная реактивация") до 3×10^8 клеток/мл (рис. 1Б, НВЧК 1). При дальнейшей инкубации культур *Mtb* доля клеток, способных к возобновлению роста в жидкой среде, снижалась и приближалась к нулю через 180 сут. Для реактивации таких бактерий требовалось внесение супернатанта (СН), полученного из активно растущих культур *Mtb*. Число клеток, восстановленных в присутствии СН, практически не менялось на протяжении 180 сут культивирования (рис. 1Б, НВЧК 2). Мы полагаем, что к данному физиологическому состоянию применимо определение «покоящиеся бактерии».

3.2. Модель хронического туберкулеза *in vivo* на основе покоящихся форм микобактерий, полученных *in vitro*

Известно, что внутритрахеальное заражение мышей всего 10^3 активными клетками *Mtb* приводит к полной гибели даже генетически резистентных мышей на 4-м месяце инфекции (Eruslanov et al., 2004).

Для оценки инфекционного потенциала овоидных покоящихся клеток *Mtb*, полученных в опытах *in vitro*, ими были заражены внутритрахеально мыши двух имбредных линий с разной устойчивостью к ТБ в дозе 10^5 бактерий на мыш. Наблюдения за динамикой прогрессирования инфекции проводили в течение 1.5 лет. После инфицирования мышей покоящимися микобактериями не наблюдалось никаких видимых признаков заболевания вплоть до 180 сут, когда мыши, чувствительные к ТБ (линия I/St) проявили первые признаки болезни (растрепанный мех и 2-3% потери массы тела). Как показано на рис. 3А, количество бактерий (КОЕ) в легких животных через 8 мес. после заражения увеличивалось в 100 раз у чувствительных к ТБ мышей I/St и в 10 раз у относительно резистентных мышей В6. Кроме того, наблюдалась диссеминация инфекции в селезенках у мышей обеих линий.

Отметим, что инфекция, вызванная покоящимися микобактериями, развивалась намного медленнее, чем инфекция, вызванная активно растущими бактериями логарифмической фазы роста. Через год после заражения мыши линии В6 внешне выглядели здоровыми, количество

клеток *Mtb* (КОЕ) в их легких ($\sim 10^5$ на орган) не менялось в период между 8 и 12 мес. инфекции (Рис. 3Б). Спустя 1.5 года у устойчивых к ТБ мышей линии В6 по достижению ранних этапов старения начали регистрироваться в органах типичные активные клетки *Mtb*. А чувствительные к ТБ мыши линии I/St к этому времени начали погибать (рис. 3Б).

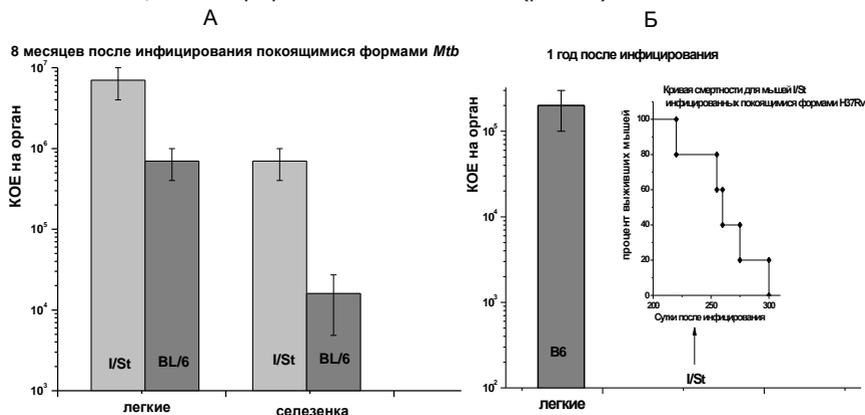


Рис. 3. Развитие инфекции у мышей, вызванной покоящимися формами *Mtb*. Мыши В6 и I/St были инфицированы покоящимися формами *Mtb*, и количество КОЕ в органах было определено после 8 (А) и 12 (Б) месяцев заражения.

Результаты, полученные при внутритрахеальном заражении мышей полученными *in vitro* ПМ, демонстрируют, что покоящиеся клетки *Mtb*, полностью или частично утратившие способность образовывать колонии на плотных средах, успешно выживают в организме млекопитающего в течение длительного времени, а затем переходят в культивируемое состояние и вызывают хроническую форму ТБ. У генетически резистентных животных развитие инфекции, вызванной покоящимися клетками *Mtb*, протекает по пути развития носительства, но не летальности. Разработанная модель адекватно имитирует хронический/латентный ТБ и может быть применена для дальнейшего изучения взаимодействий между хозяином и патогеном, а также тестирования вакцин и лекарств-кандидатов, предназначенных для борьбы с латентным ТБ.

3.3. Характеристика покоящихся микобактерий

При переходе микобактерий из палочковидной формы в овоидную в процессе постепенного закисления внешней среды в пост-стационарных культурах наблюдалось заметное торможение метаболической активности. Значительно снижались активности синтеза РНК и ДНК, оцененные по включению их радиоактивных предшественников, а также сильно снижался уровень внутриклеточных АТФ и цАМФ (Таблица 2). Отсутствие восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP) и метиленового синего овоидными формами *Msm* и *Mtb* указывало на ингибирование в них дыхания. При развитии закисления (рис. 1Б) в клетках *Mtb* снижалась активность синтеза РНК в 7.5 раз, оцененная по включению 5,6-3Н-урацила, что сопровождалось снижением способности расти на плотных средах (КОЕ) (Таблица 2, рис. 1А). При дальнейшем хранении закисленных культур в статических условиях без доступа кислорода (70 сут.) скорость включения радиоактивной метки снижалась до недетектируемых значений (Таблица 2). Также, при формировании овоидных клеток с «некультивируемым» фенотипом в них снижался уровень АТФ и цАМФ (Таблица 2).

Несмотря на то, что концентрация динуклеотидов в покоящихся бактериях была в 10 раз меньше, чем в активных, соотношение НАД/НАДН оказалось практически одинаково (Таблица 2), что может свидетельствовать в пользу протекания реакций, вследствие которых происходит

равновесная генерация и расходование НАДН в ПМ. Хотя уровни АТФ (особенно для *Mtb*), цАМФ, НАД, НАДН и активность дыхательной цепи (табл. 2) были существенно снижены в ПМ, но все-таки детектировались, можно предположить, что ПМ обладают остаточным метаболизмом, возможно, необходимым для поддержания жизнеспособности клетки в период длительного покоя.

Таблица 2. Биохимические изменения в клетках *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* при переходе в состояние покоя. В закращенных полях представлены данные для *Mtb*. Вегетативные клетки *Msm* - 2 сут культивирования, *Mtb* – 10 сут; клетки стационарной фазы *Msm* – 20 сут, *Mtb* – 40 сут; оводные клетки: *Msm* – 60 сут, *Mtb* – 70 сут.

Параметр		Вегетативные клетки	Клетки стационарной фазы	Овоидные клетки	
Включение радиоактивной метки (имп/мин)	Тимидин [³ H]	40196 ± 2354	7560 ± 1524	860 ± 101	
	Урацил [³ H]	93286 ± 3730	12340 ± 1632	408 ± 94	
		76 327 ± 2519	12 984 ± 1924	350 ± 74	
Внутриклеточная концентрация АТФ в культуре, нМ*		514 ± 41.12	264 ± 15.84	183 ± 9.15	
цАМФ пмоль/мг влажной биомассы бактерий		569 ± 47	341 ± 22.7	9.7 ± 8.2	
		116±16	-	28±6	
Плавающая плотность клеток (г/мл)		124±4	-	2±1	
		1.214 ± 0.01	1.23 ± 0.01	1.278 ± 0.01	
Активность дыхательной цепи: Восстановление DCPiP, нмоль DCPiP /мин/ мг клеток		1.30 ± 0.1	-	1.60 ± 0.1	
		0.18±0.01	-	0.01±0.005	
Термо-устойчивость клеток (% от контроля без прогревания)*		0.11±0.03	-	0.016±0.003	
		60 °C	65±5	75±4	85±7
*		70 °C	1±0,5	-	70±5
		80 °C	9±3	12±4	18±4
Устойчивость клеток к антибиотикам**		0.002±0,001	-	70±5	
		2±1	4±2	10±6	
Гигромицин		0	-	0.5±0.1	
		1×10 ²	2×10 ³	1×10 ⁷	
Тетрациклин		1×10 ³	-	5×10 ⁷	
		1×10 ⁵	1×10 ⁶	1×10 ⁷	
Рифампицин		1×10 ⁶	-	6×10 ⁷	
		1×10 ⁴	-	1×10 ⁸	
Метаболиты					
НАД, нмоль/мг влажного веса клеток		38±12	-	3.7±1	
НАДН, нмоль/мг влажного веса клеток		153±17	-	13.7±2	
Соотношение НАД/НАДН		4.03	-	3.7	

* Концентрация АТФ в мл культуры при одинаковом количестве клеток (1×10⁹ КОЕ/мл)

** Доля клеток после термообработки в течение 10 мин, непрокрашиваемых йодистым пропидием, определяемая по результатам прямых микроскопических подсчетов. Относительная ошибка 5%.

*** Остаточное число бактерий (КОЕ/мл *M. smegmatis* и НВЧК для *M. tuberculosis*) после воздействия 100 мкг/мл тетрациклина, 50 мкг/мл гигромицина и 20 мкг/мл рифампицина на 1×10⁸ клеток (1 сут для *M. smegmatis* и 17 сут для *M. tuberculosis*).

3.3.1. Биохимические и микробиологические характеристики ПФ микобактерий

Полученные при постепенном снижении pH среды овоидные клетки представляли собой контрастные овоидные формы с утолщенной слоистой клеточной стенкой и электронно-плотной цитоплазмой (рис. 2). По данным атомно-силовой микроскопии (рис. 2 К, Л), размеры вегетативных клеток *Msm* в экспоненциальной фазе роста составляли в среднем 3.7×0.8 мкм и значительно отличались от размеров овоидных форм – 1.2×0.9 мкм.

Овоидные клетки в 60-180-суточных культурах *Mtb*, полученные при соответствующих условиях, характеризовались уменьшенными размерами ($1.2-1.5 \times 0.6-0.7$ мкм) по сравнению с клетками стационарной фазы ($2.5-3 \times 0.4-0.5$ мкм). Различия в значении плавучей плотности между вегетативными клетками и покоящимися, особенно для *Mtb* (1.3 г/мл и 1.6 г/мл, соответственно), возможно, отражают увеличение белок-липидного соотношения в покоящихся клетках (табл. 2).

Овоидные клетки *Mtb* в 70-суточных культурах обладали повышенной устойчивостью к термообработке, в отличие от вегетативных клеток (табл. 2). Число КОЕ-образующих реактивированных покоящихся микобактерий после прогревания при 70 °C в течение 10 мин было в 50 раз меньше по сравнению с контролем без прогревания, в то время как вегетативные клетки практически не восстанавливались после воздействия той же температуры. Также покоящиеся овоидные клетки были также более устойчивы к воздействию антибиотиков: гигромицина (50 мкг/мл), тетрациклина (100 мкг/мл) и рифампицина (20 мкг/мл), по сравнению с метаболически активными клетками. В частности, при воздействии 50 мкг/мл гигромицина на клетки *Msm* (10^8 КОЕ/мл) в течение 24 ч, остаточная выживаемость составляла 10^7 КОЕ/мл для покоящихся форм, тогда как для вегетативных клеток 10^2 КОЕ/мл (табл. 2).

Однако, протонированные диаллиламмониевые полимеры проявляли сильное бактерицидное действие в отношении как вегетативных, так и покоящихся клеток *Msm* и *Mtb*. Механизм их действия основан на взаимодействии их протонированных аммониевых групп с липидами микобактериальной мембраны и ДНК. Эти вещества могут применяться в качестве дезинфицирующих средств против всех типов клеток *Mtb*.

Таким образом, овоидные формы микобактерий, обладающие: (1) выраженными морфологическими изменениями; (2) «некультивируемым» фенотипом; (3) сохранением жизнеспособности в течение длительного времени; (4) очень низкой метаболической активностью; (5) устойчивостью к стрессорным воздействиям (температура и антибиотики); (6) способностью к реактивации; (7) сохранением инфекционного потенциала - соответствуют всем критериям, применяемым для характеристики микобактерий на стадии латентного ТБ.

3.3.2. Запасенные вещества покоящихся микобактерий

Для изучения эндогенных метаболитов, накопленных микобактериями при переходе в состояние покоя, которые потенциально могут участвовать в поддержании минимального метаболизма и жизнеспособности покоящихся микобактерий за счет катаболических реакций, был проведен анализ гидрофобных и гидрофильных метаболитов, экстрагированных из покоящихся клеток *Msm*, методом ЯМР.

3.3.2.1. Трегалоза

В спектре ^1H -ЯМР (растворитель D_2O) соединений, экстрагированных водно-метанольной смесью из овоидных клеток *Msm* был выявлен значительный дуплетный сигнал с химсдвигом 5.18-5.19, специфичный для аномерных протонов известного дисахарида трегалозы (рис. 4). Соответствующие пики отсутствовали в экстракте вегетативных клеток бактерий.

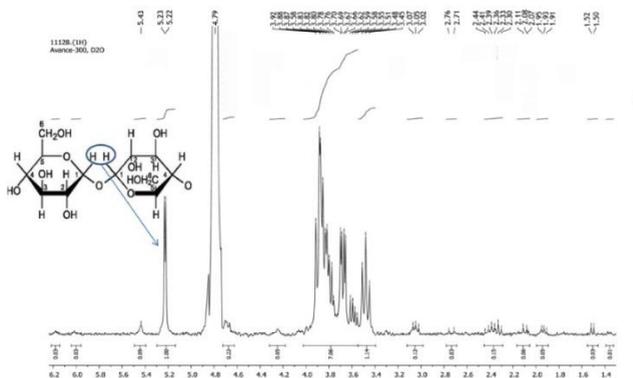


Рис. 4. ^1H -ЯМР спектр водно-метанольного экстракта покоящихся оvoidных форм *M. smegmatis*. Сигнал на 5,18-5,19 ppm в спектре принадлежит аномерному протону трегалозы.

Методами ТСХ и ЯМР было продемонстрировано значительное возрастание количества этого дисахарида в процессе перехода бактерий в состояние покоя (рис. 5).

Содержание трегалозы в покоящихся клетках *Msm* составляло 16-18 % от сухого веса клеток. В активных клетках *Msm* содержалось гораздо меньше свободной трегалозы (0.35 ± 0.12 мкг/мг влажного веса клеток) в отличие от покоящихся форм (6.5 ± 0.4 мкг/мг влажного веса клеток), находяющихся в состоянии покоя 75 сут.

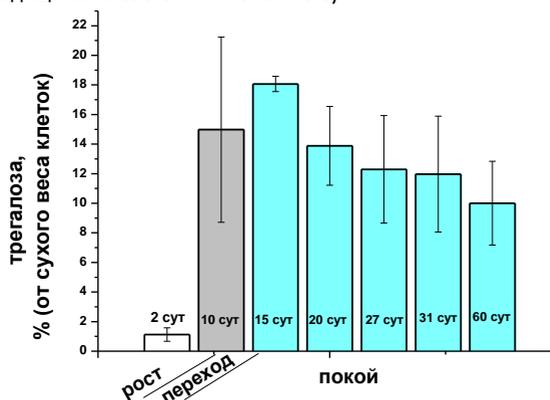


Рис. 5. Количество трегалозы в клетках *M. smegmatis* в процессе образования и хранения покоящихся форм.

В протеоме ПМ были обнаружены ферменты синтеза трегалозы. Уровень транскрипции генов биосинтеза трегалозы во время перехода микобактерий в состояние покоя постепенно возрастал (рис. 6).

В протеомном профиле оvoidных покоящихся клеток *Mtb* было также обнаружено возрастание количества ферментов, участвующих в синтезе трегалозы (особенно Rv2006/otsB1), при этом анализ водно-метанольного экстракта клеток *Mtb* выявил увеличение содержания трегалозы в 4-5 раз в оvoidных клетках, находившихся в состоянии покоя 4.5 месяца (2.2 ± 0.3 мкг/мг влажного веса клеток) по сравнению с вегетативными (0.4 ± 0.15 мкг/мг влажного веса клеток).

Биосинтез трегалозы

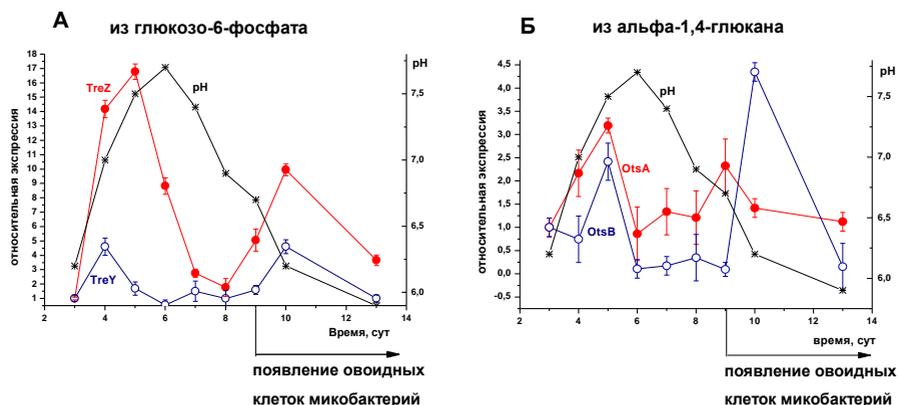


Рис. 6. Относительная экспрессия генов путей синтеза трегалозы в период перехода клеток *Msm* в состояние покоя. Представлена относительная экспрессия генов OtsA-OtsB пути (А) и TreY-TreZ пути (Б).

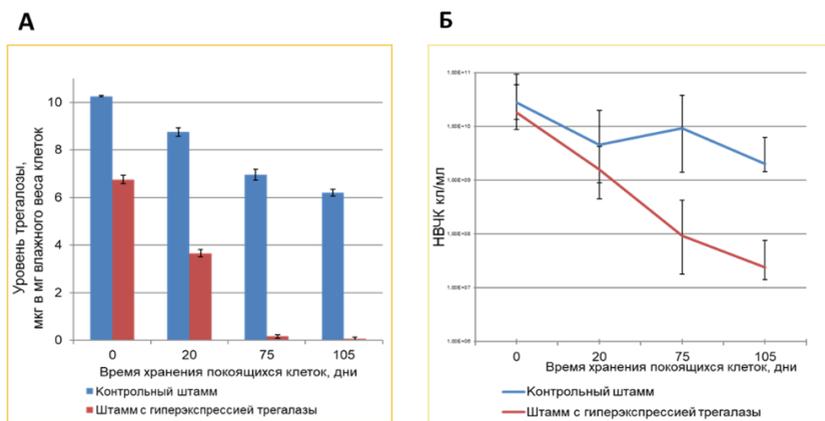


Рис. 7. Корреляция между уровнем внутриклеточной трегалозы (А) и жизнеспособностью (Б) покоящихся оvoidных форм *M. smegmatis* при длительном хранении микобактерий в слабокислых условиях. Жизнеспособность бактерий оценивали при их росте в жидких средах (НВЧК), концентрацию трегалозы определяли методом ВЭЖХ.

Для подтверждения роли трегалозы в поддержании покоящегося состояния было исследовано поведение клеток *Msm* в состоянии длительного покоя путем варьирования концентрации внутриклеточной трегалозы. В связи с этим был сконструирован штамм *Msm*, гиперэкспрессирующий ген *MSMEG_4535* (штамм pES_MSMEG_4535), который кодирует трегалазу, осуществляющую гидролиз трегалозы до глюкозы. Этот подход обеспечивал изменение содержания трегалозы внутри клетки. Микобактерии штамма с гиперэкспрессией трегалозы не отличались от клеток контрольного штамма во время активного роста культуры и были способны к формированию покоящихся клеток. При исследовании оvoidных клеток этого штамма в период их длительного хранения было обнаружено постепенное снижение

концентрации внутриклеточной трегалозы до практически нулевых значений к 75 сут. инкубации в отличие от контрольного штамма (рис. 7). Параллельно с этим, в культуре покоящихся клеток штамма с гиперэкспрессией трегалазы увеличивалось количество погибших бактерий, выявленное методом НВЧК, что свидетельствует о корреляции между концентрацией трегалозы в покоящихся клетках микобактерий и их жизнеспособностью в период длительного покоя.

3.3.2.2. Порфирины

Другой особенностью покоящихся клеток *Msm* было накопление (как в клетках, так и в культуральной жидкости) больших количеств красного флуоресцирующего пигмента, спектры поглощения которого были характерны для порфиринов (рис. 8А).

Порфириновая природа обнаруженного пигмента была подтверждена ^1H -ЯМР анализом экстрактов покоящихся овоидных клеток *Msm*. В спектре ЯМР присутствовали характерные для порфиринового кольца химические сдвиги сигналов. Дуплет с химсдвигом 10.1 мд относится к мезопротонам порфиринового кольца, сигнал 7.3мд – остаточный протон в дейтерохлороформе. Дуплеты около 5.3 и 4.2мд - протоны в глицерине этерифицированном жирной кислотой, химсдвиги 4.4 и 3.3 мд отражают протоны пропионовой кислоты на кольце порфирина, а мультиплет при 3.7 мд – метильные протоны порфиринового кольца и метокси групп в эфирах пропионовой кислоты. Остальные протоны от 0.9 до 3.0 мд соответствуют жирным кислотам, в которых соотношение $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$ -групп равно 1:12, что указывает на высокую степень разветвленности цепи. (Рис. 9). Данные ЯМР, а также масс-спектропии позволили заключить, что основным пигментом, накапливающимся в покоящихся формах *Msm* является тетраметилловый эфир копропорфирина III.

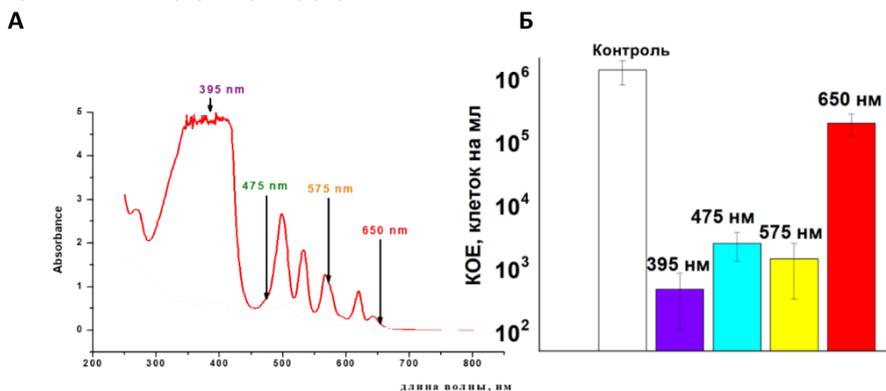


Рис. 8. Фотодинамическая инактивация покоящейся культуры *M. smegmatis* при разных длинах волн. После 15 минут воздействия в статических условиях 100 мкл клеточной суспензии высевали на чашки с агаром для оценки КОЕ.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия покоящихся клеток *Msm* подтвердила накопление копропорфиринов согласно их спектрам флуоресценции и времени жизни. Спектрометрический анализ хлороформ-метанольных экстрактов покоящихся клеток *Mtb* также подтвердил накопление в них порфиринов (рис.10).

Оценка количества порфиринов в культурах *Mtb* продемонстрировала, что активно растущие вегетативные микобактерии содержат $0,033 \pm 0,01$ нг порфиринов/мг влажного веса клеток, а покоящиеся формы – $0,25 \pm 0,05$ нг порфиринов/мг влажного веса клеток, т.е. в 6 раз больше (табл. 3). В овоидных клетках *Msm* содержание порфиринов было выше: $7 \pm 0,05$ нг/мг влажного веса клеток в активных бактериях и $300 \pm 0,1$ нг/мг в покоящихся формах.

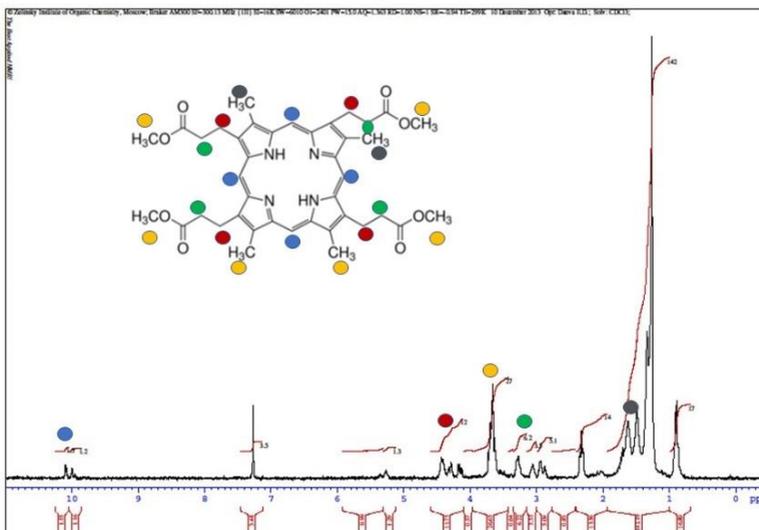


Рис.9. ^1H -ЯМР анализ экстракта покоящихся оvoidных форм *M. smegmatis*.

Протеомный анализ (см. ниже) оvoidных клеток *Msm* выявил в них значительное присутствие ферментов синтеза порфирина (порфирилиногендеаминазы/MSMEG_0953; дегидратазы дельта-аминолевулиновой кислоты/MSMEG_0956; декарбоксилазы уропорфириногена/MSMEG_2780), в отличие от вегетативных клеток микобактерий. Даже после многочисленных экстракций смесью хлороформ-метанол-вода покоящихся клеток они остаются окрашенными в бежевый цвет и этот остаточный краситель извлекается подкисленным метанолом (0.1M HCl) давая порфириновый спектр.

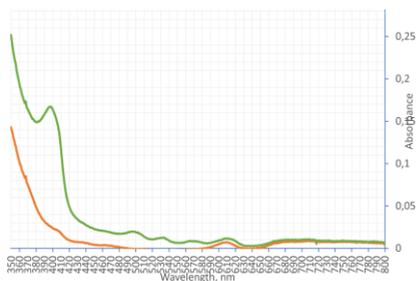


Рис. 10. Спектр поглощения хлороформ-метанольного экстракта активных и покоящихся форм *Mycobacterium tuberculosis*.

Зеленый цвет - покоящиеся *Mtb*
Красный цвет - активные *Mtb*

Таким образом, можно предположить, что этерифицированные гидрофобные формы порфиринов встраиваются в зоны расположения миколовых кислот в клеточной оболочке, усиливая плотность и прочность их упаковки, а неэтерифицированные (гидрофильные) порфирины содержащие до 8 карбоксильных групп на молекулу, взаимодействуя с поверхностью разных полимеров от полисахаридов оболочки до белков цитоплазмы стабилизируют и консервируют клеточные структуры, подготавливая их к переживанию неблагоприятных условий.

3.3.2.2.1. Фотодинамическая инактивация покоящихся клеток *M. smegmatis* посредством их эндогенных порфиринов

Поскольку порфирины используются в качестве фотосенсибилизаторов при лечении некоторых видов опухолей и кожных инфекций методами фотодинамической терапии, обнаруженное накопление эндогенных порфиринов при переходе микобактерий в состояние покоя создает предпосылки для возможной фотодинамической инактивации (ФДИ) этих форм бактерий.

При оценке влияния света с различными длинами волн на жизнеспособность покоящихся клеток *Msm* наибольшая их инактивация после 15 мин экспозиции наблюдалась при 395 нм (плотность мощности 200 кВ/см²) и 575 нм (плотность мощности 610 мВ/см²) (рис. 8Б), что соответствует основным пикам спектра поглощения экстрагированных порфиринов (около 400 нм и 550–600 нм). В то же время, освещение при длине волны 650 нм (плотность мощности 1000 мВ/см²), лежащей за пределами спектра поглощения порфиринов, не привело к значительному снижению жизнеспособности микобактерий.

Был проведен анализ влияния времени воздействия света при 395 и 575 нм на жизнеспособность покоящихся и активных клеток *Msm*. При использовании светодиода 395 нм покоящиеся бактерии быстро погибали в течение 5 мин воздействия, демонстрируя снижение числа КОЕ с 10⁷ до 2х10⁴; однако продолжающееся освещение не привело к дальнейшему падению числа КОЕ (рис. 11А). Подобное быстрое падение численности КОЕ в течение первых пяти минут освещения было обнаружено также при использовании светодиода 575 нм (рис. 11Б). Однако в этом случае при увеличении времени воздействия наблюдалось дальнейшее медленное снижение числа КОЕ.

Вегетативные клетки не реагировали на освещение в этой области спектра. По данным проточной цитометрии с использованием индикатора повреждения мембран - иодида пропидиума, после 30 мин воздействия светом на популяцию покоящихся форм *Msm* около 60 процентов (58.73 ± 4.9%) клеток были повреждены.

Таким образом, освещение клеток *Msm* приводило к инактивации микобактерий, находящихся в состоянии покоя, в противоположность действию света на вегетативные клетки бактерий логарифмической фазы роста.

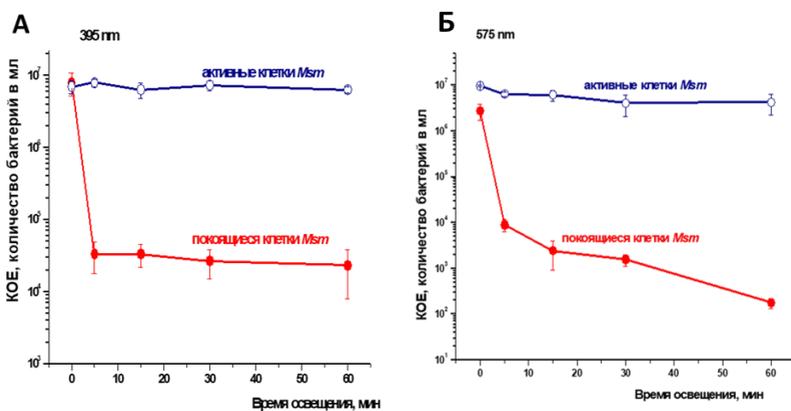


Рис. 11. Выживаемость активных и покоящихся клеток *M. smegmatis* при освещении в течении разных промежутков времени.

3.3.2.2. АЛК-индуцированный синтез порфиринов в клетках *Mtb* при переходе в состояние покоя *in vitro* и при персистенции внутри макрофага способствует успешности их фотодинамической инактивации

Проведение ФДИ с покоящимися клетками *Mtb* оказалось не эффективным, очевидно из-за низкого содержания порфиринов. Для стимуляции образования метаболитов синтеза гема к культурам *Mtb*, находящимся на стадии перехода в состояние покоя, был добавлен один из предшественников в цепи биосинтеза гема - 5-аминолевулиновая кислота (АЛК). Действительно, при этих условиях было отмечено накопление флюоресцирующих веществ порфириновой структуры (табл. 3) при общем возрастании количества порфиринов в покоящихся клетках *Mtb* в 85 раз до значения 17 нг/мг влажного веса клеток (табл. 3). Покоящиеся клетки *Mtb*, полученные в присутствии АЛК, подвергали воздействию света с длинами волн 532 нм (плотность мощности 250 мВ/см²) и 565 нм (плотность мощности 180 мВ/см²), которые соответствуют поглощению порфирина, в течение 5-60 мин. Освещение бактерий лазерным лучом приводило к инактивации покоящихся форм *Mtb* в соответствии с уменьшением количества жизнеспособных бактерий, оцененных методом НВЧК (рис. 12А).

Таблица 3. Содержание порфиринов в активных и покоящихся клетках *M. tuberculosis*, выращенных в присутствии 5-аминолевулиновой кислоты и без нее.

тип клеток <i>Mtb</i>	нг/мг влажного веса клеток		
	Копропорфирин III (КП)	Уропорфирин III	тетраметилловый эфир КП
покоящиеся	0	0,1 ± 0,004	0,12 ± 0,0002
покоящиеся + АЛК	3,85 ± 0,021	1,7 ± 0,02	11,31 ± 0,005
активные	0	0,033 ± 0,01	0
активные + АЛК	1,65 ± 0,12	2,48 ± 0,19	1,42 ± 0,1

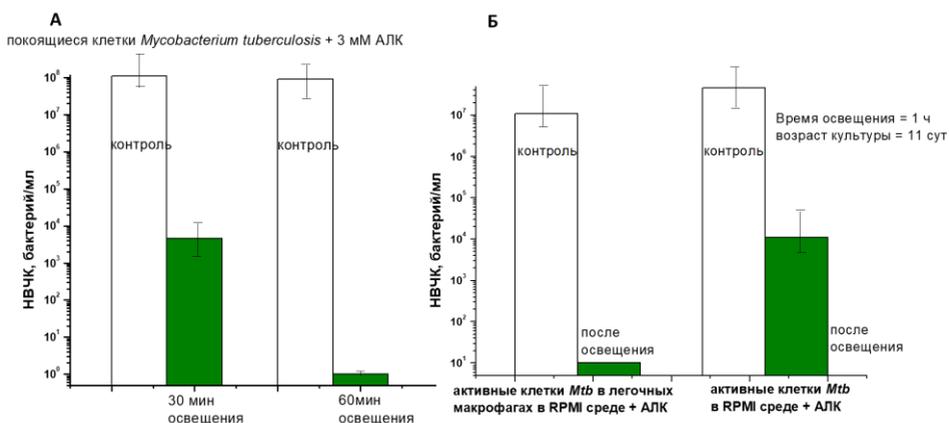


Рис. 12. Фотодинамическая инактивация покоящейся культуры *M. tuberculosis* (А) и активных клеток *Mtb* в макрофагах при 565 нм.

При этом не наблюдалось влияния ФДИ на вегетативные клетки бактерий *in vitro*, так как эти бактерии не содержат свободных порфиринов в достаточных количествах. При введении в среду

роста АЛК вегетативные клетки *Mtb* также приобретали достаточно выраженную чувствительность к освещению (рис. 12Б).

В отдельной серии экспериментов была исследована фоточувствительность вегетативных клеток *Mtb*, персистирующих в макрофагах. После пребывания в течение нескольких дней активных клеток *Mtb* в макрофагах в присутствии АЛК наблюдалась их значительная фотоинаktivация (около 99,99%) (рис. 12Б), сопоставимая с действием на покоящиеся клетки *Mtb in vitro*. Очевидно, что клетки, захваченные макрофагами, подвергаются воздействию стрессорных факторов макрофага, что может, по-видимому, приводить к замедлению метаболизма и накоплению порфиринов.

Таким образом, впервые было продемонстрировано успешное применение ФДИ для инаktivации покоящихся клеток *Mtb* и вегетативных клеток микобактерий, находящихся в макрофагах, что обусловлено значительным накоплением эндогенных порфиринов.

3.3.3. Особенности протеомного профиля покоящихся микобактерий.

Анализ протеомов проводили для покоящихся и вегетативных клеток *Mtb* (возраст – 4,5; 13 мес и 10 сут) и *Msm* (возраст - 1 месяц и 2 сут). В результате были получены воспроизводимые белковые паттерны для цитоплазматических и мембранных белков покоящихся и активно размножающихся микобактерий (рис. 13, 14). С применением двумерного электрофореза различных фракций клеток *Mtb* и последующей MALDI масспектроскопии были идентифицированы около 350 различных белков (суммарно во фракциях цитозоля и мембран) для вегетативных клеток, для покоящихся клеток этот показатель составлял 155 различных белков для ранней фазы покоя и 192 белка для длительно хранившихся ПМ. Сравнение паттернов двумерных фореов и идентификация белков выявило достаточно близкое распределение белков в цитозоле вегетативных и покоящихся клеток *Mtb* по различным категориям KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). В то же время этот анализ распределения белков мембранной фракции выявил различия. Обращает на себя внимание уменьшение доли белков в категории «cell wall processes» во фракции мембран у покоящихся клеток по сравнению с вегетативными, что вероятно связано с отсутствием репликации в ПК. Наблюдается увеличение доли белков в категории «intermediary metabolism and respiration», за счет белков биосинтеза глутамина, гликолитического пути, белков цикла Кребса, глиоксилатного пути, ферментов шикиматного пути биосинтеза фенольных соединений. Для отдельных ферментов овоидных форм *Msm* была подтверждена энзиматическая активность *in vitro* (табл. 4).

Таблица 4. Активность некоторых ферментов в активных и покоящихся клетках *M. smegmatis*

Ферментативные активности	Активные клетки	Покоящиеся клетки
	μмоль мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	
Глицеролкиназа	665±49	78±49
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	2550±190	93±4
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	322±15	108±9
Фосфоглицераткиназа	618±46	241±17
Пируваткиназа	655±23	395±32
Лактатдегидрогеназа (хинон-зависимая)	350±20	270±30
Лактатдегидрогеназа (ферментирующая)	0	0
Алкогольдегидрогеназа	200±130	80±40
Изоцитратлиаза	68±33	0
НАДН-оксидаза	221±40	8±3

Увеличение доли белков во фракции «virulence, detoxification, adaptation» отражает развитие адаптации к неростовым условиям и включение защитных механизмов при переходе клеток в покоящееся состояние. Сравнение протеомов и идентификация белков выявили суммарно 90 белков во фракциях цитозоля и мембран, представленных в протеоме покоящихся клеток и отсутствующих в вегетативных клетках. Это количество значительно превышает число дифференциально экспрессируемых белков в других моделях покоя *Mtb*: нерепликативного состояния в анаэробии (21 белок) (Rosenkrands et al, 2002, Starck et al, 2004); модели голодания в бедной среде (7 белков) (Betts et al 2002); модели поздней стационарной фазы (10 белков) (Ang et al 2014), что указывает на другое, возможно, более глубокое состояние покоя бактерий в исследуемой модели.

Обнаружено, что в протеоме ПК в отличие от протеома активно делящихся клеток хорошо представлены ферменты, участвующие в процессах деградации жиров, белков и полисахаридов. Для протеома покоящихся микобактерий было характерно выраженное разнообразие энзимов, участвующих в инактивации активных форм кислорода (АФК): тиолпероксидаза, каталаза/пероксидаза, супероксиддисмутазы, альдо/кеторедуктаза, алкилгидропероксидаза, алкилгидропероксидредуктазы.

Известно, что для защиты от окислительного стресса во многих бактериях синтезируется глутатион, который обладает токсичностью для микобактерий (Dayaram et al., 2006). Однако в микобактериях имеются пути синтеза метаболитов, способных, как и глутатион восстанавливать окисленные биомолекулы. К таким веществам принадлежат тиоредоксин и микотиол. Ферменты, участвующие в синтезе микотиола, обнаружены в протеоме покоящихся форм *Msm*, но не *Mtb*, («уникальные» для покоящихся форм MSMEG_5129, MSMEG_5261). В покоящихся клетках *Mtb* был выявлен другой функциональный эквивалент глутатиона — тиоредоксин, а именно тиоредоксин С (Rv3914), а также была обнаружена тиоредоксин-редуктаза (Rv3913), участвующая в восстановлении тиоредоксина.

В протеомном профиле покоящихся овоидных микобактерий было выявлено большое разнообразие шаперонов (dnaJ1/Rv0352; groEL2/Rv0440, dnaK/MSMEG_0709/Rv0350; GroL MSMEG_0880, groEL1/Rv3417, hspX/Rv2031 /MSMEG_3932; groES/Rv3418; htpG/Rv2299, триггер фактор MSMEG_4674/Rv2462; ClpB MSMEG_0732/Rv0384c), способных защищать белки от действия АФК, а также участвующих в процессах их репарации. В ПМ обеих бактерий обнаруживаются бактериоферритины – белки, участвующие в запасании железа, важнейшего элемента для жизнедеятельности микобактерий. Также в ПМ увеличена доля ферментов, входящих в пентозофосфатный путь, что может обеспечивать клетку восстановленным НАДФ, используемым совместно с глутатион-пероксидазой и каталазой для защиты клеточных компонентов от активных радикалов. Увеличено также содержание ферментов гликолитического пути. Обнаружены в значительном количестве цитохромная лактат дегидрогеназа и ферредоксин PdxC. Обнаружено накопление неорганической пирофосфатазы Ppa. Выявлены белки, участвующие в синтезе глутамина, микотиола (участвует в детоксикации), рибофлавина, пиридоксин/пиридоксаль и гистидина. Кроме этого, выявлены ферменты гликолитического пути, который в отсутствие работы дыхательной цепи может участвовать в синтезе макроэргов.

Обнаружены белки, связывающиеся с ДНК с возможной ролью компактизации хромосомы (Rv0341 и Rv2986c). Несмотря на отсутствие процессов репликации, транскрипции и трансляции в покоящихся клетках, в них были обнаружены некоторые транскрипционные регуляторы. Большинство обнаруженных регуляторов оказалось репрессорами, что отражает ингибирование метаболических процессов при переходе в состояние покоя. Среди нескольких регуляторных белков можно выделить негативный регулятор транскрипции Rv2711. Помимо того, обнаружены

специфические регуляторы адаптации к стрессу (MprA Rv0981/MSMEG_5488; phoP/Rv0757; Wag31/Rv2145).

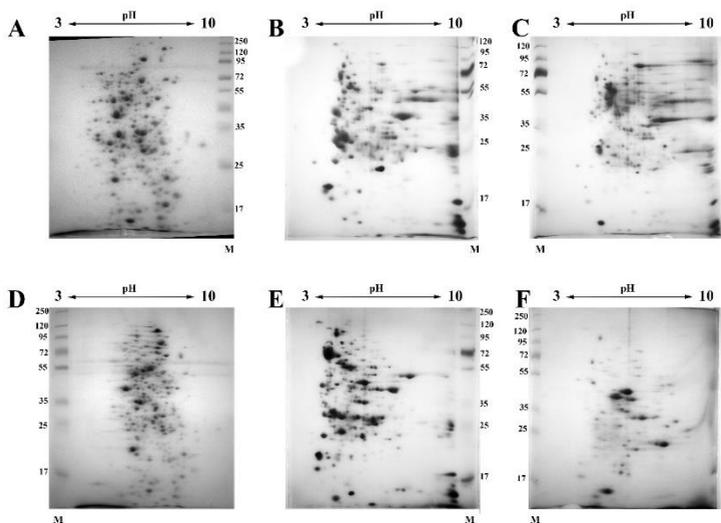


Рис. 13. 2D-электрофореграммы активно растущих и покоящихся форм *M. smegmatis*. А, В, С – активно растущие клетки, поздняя логарифмическая фаза роста; D, E, F – покоящиеся овоидные клетки (1 месяц хранения). А, D – фракции цитозоля; В, Е – CHAPS – экстракт фракции мембран; С, F – SDS - экстракт фракции мембран.

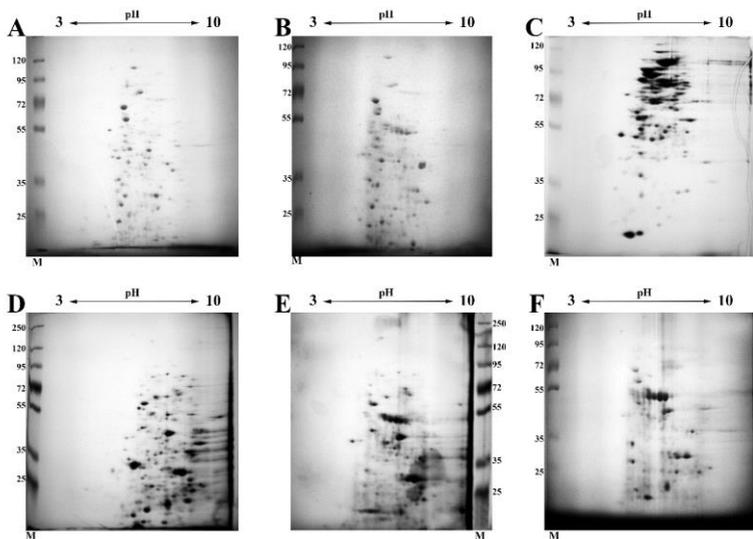


Рис. 14. 2D-электрофореграммы активно растущих и покоящихся форм *M. tuberculosis*. А, D – активно растущие клетки, поздняя логарифмическая фаза роста; В, Е – покоящиеся овоидные клетки (4.5 месяцев хранения) П1; С, F – покоящиеся овоидные клетки (13 месяцев хранения) П2. А, В, С – фракции цитозоля; D, E, F – SDS - экстракт фракции мембран.

Обнаружены белки, связывающиеся с ДНК с возможной ролью компактизации хромосомы (Rv0341 и Rv2986с). Несмотря на отсутствие процессов репликации, транскрипции и трансляции в покоящихся клетках, в них были обнаружены некоторые транскрипционные регуляторы. Большинство обнаруженных регуляторов оказалось репрессорами, что отражает ингибирование метаболических процессов при переходе в состояние покоя. Среди нескольких регуляторных белков можно выделить негативный регулятор транскрипции Rv2711. Помимо того, обнаружены специфические регуляторы адаптации к стрессу (MprA Rv0981/MSMEG_5488; PhoP/Rv0757; Wag31/Rv2145).

Среди белков, участвующих в транспортной функции мембраны, найдены транспортер, обеспечивающий транспорт липополисахарида через мембрану и транспортер, участвующий в осмопротекции (транспорт осмопротекторов внутрь клетки). Еще раз отметим, что в покоящихся микобактериях выявлены белки, участвующие в синтезе трегалозы и порфирина (см. выше).

В ПК обнаружено большое количество белков с неизвестной функцией, отсутствующих у активных бактерий. Среди них наиболее представленными являются Rv0341 (для *Mtb*) и MSMEG_6227 (для *Msm*), которые, как нами было выяснено, образуют комплексы с ДНК различной молекулярной массы. При этом, в отличие от активных клеток в протеоме ПМ практически отсутствовали белки, участвующие в следующих биосинтетических путях: синтезе пуринов, миколовых кислот, лейцина, фенольных гликолипидов, жирных кислот, фосфатидилинозитола, биосинтезе клеточной стенки, а также в метаболизме ДНК.

Большая представленность ферментов, участвующих в деградации основных полимеров клетки, позволяет высказать предположение, что в покоящихся клетках протекают катаболические реакции, что, возможно, позволяет использовать продукты гидролиза в поддержании жизнеспособности покоящейся бактерии довольно длительное время, используя имеющиеся ферменты и метаболические пути (например, в отсутствии дыхания покоящиеся клетки могут использовать гликолитический путь для образования макроэргических соединений). В состоянии подавления биосинтетических процессов сохраняющиеся ферменты и белки могут быть рассмотрены также в качестве запасенных и необходимых для быстрого запуска процесса реактивации при наступлении благоприятных для роста условий.

3.3.4. Микобактериальная клетка в состоянии покоя.

Обобщая вышеприведенные результаты, можно заключить, что как патогенные, так и непатогенные сапрофитные микобактерии способны под воздействием определенных стрессорных факторов, в частности при адаптации к постепенному закислению внешней среды, переходить в состояние покоя, характерными признаками которого является низкая или отсутствующая активность метаболизма клетки, отсутствие деления, устойчивость к ряду антибиотиков (в частности, к рифампицину), термоустойчивость, выраженные морфологические изменения и потеря способности к росту на стандартных плотных средах («некультивируемость»).

Микобактерии в состоянии глубокого покоя характеризуются овоидной формой клетки со значительно утолщенной клеточной стенкой. Практически не детектируется мембранный потенциал ($\Delta\Psi$) (Nikitushkin, 2020), отсутствуют процессы репликации, транскрипции и трансляции.

Мембрана таких клеток содержит значительное количество метиловых эфиров копропорфирина, предположительно выполняющих стабилизирующую роль.

Несмотря на практическое отсутствие биосинтетических процессов в ПМ, нельзя исключить, что в таких клетках имеет место замедленный метаболизм, возможно репаративный, о чем свидетельствует остаточный уровень АТФ, цАМФ и соотношения НАД/НАДН.

Отметим, что в цитоплазме кроме трегалозы имеются, как показано в работе Nikitushkin et. al. (2020), трегалозо-6-фосфат, глицерин, лактат, янтарная, фумаровая кислоты и другие метаболиты. Поскольку в ПМ представлены практически все ферменты гликолиза, а также ферменты цикла трикарбоновых кислот, превращающих пируват до сукцината, можно предположить превращение веществ в гликолитическом пути и далее в цикле Кребса. В результате может иметь место накопление органических кислот, которые экскретируются из клетки и закисляют среду. Такое накопление кислот было подтверждено экспериментально. Подобный механизм может позволить окисление восстановительных эквивалентов, образованных при гликолизе, синтезировать АТФ и за счет электрогенного выброса сукцината генерировать диффузионный мембранный потенциал (Zimmermann, 2015).

Имеется значительное количество ферментов, участвующих в защите от окислительного стресса, детоксификации (супероксиддисмутаза, пероксидаза), а также молекулярные шапероны, способные защищать белки от действия АФК, а также белки, участвующие в процессах их репарации. В ПМ имеются пути синтеза веществ (тиоредоксина и микотиола), способных восстанавливать окисленные биомолекулы.

Протеомный профиль покоящихся микобактерий обогащен ферментами, принимающими участие в гидролизе основных компонентов клетки (белков, пептидов, аминокислот, липидов и жирных кислот): гидролазы липидов, протеазы и пептидазы, полинуклеотидфосфорилаза (MSMEG_2656), которая входит в состав РНК деградосом и участвует в деградации мРНК. Таким образом, в ПМ обнаружено значительное количество гидролитических ферментов, что, с одной стороны обеспечивает утилизацию поврежденных в результате стресса биомолекул, а с другой стороны продукты ферментативной активности этих энзимов могут участвовать в поддержании энергетического статуса и жизнедеятельности бактериальной клетки при ее длительном выживании в состоянии покоя, которое мы предлагаем называть «катаболическое выживание».

Полученные в настоящей работе покоящиеся «некультивируемые» микобактерии, способные выживать в течение длительного времени в условиях стресса, являются хорошим инструментом для выявления механизмов их перехода к активному росту и делению, что важно для выяснения механизмов реактивации латентного ТБ. Этой проблеме посвящен следующий раздел работы.

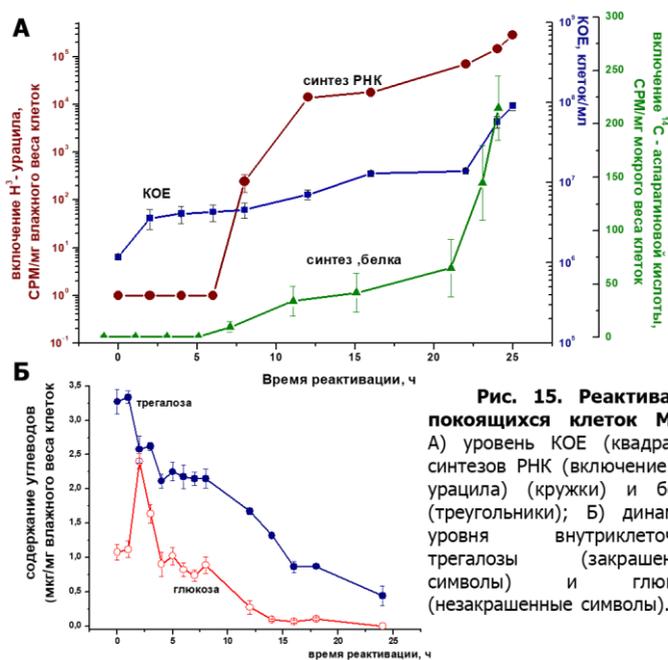
3.4. Реактивация покоящихся «некультивируемых» микобактерий

Для экспериментов по изучению механизмов реактивации использовали ПМ, находящиеся на третьей стадии покоя, для которой было характерно отсутствие способности покоящихся клеток к самореактивации в свежей жидкой среде.

3.4.1. Роль трегалозы/трегалазы в реактивации покоящихся *Mycobacterium smegmatis*.

Было обнаружено, что при реактивации покоящихся микобактерий, хранившихся в течение 3.5 - 5 месяцев в закисленных культурах при комнатной температуре, и перенесенных в свежую жидкую среду наблюдается выраженная лаг-фаза (до 6 - 8 часов). В этой фазе не происходит активных биосинтетических процессов, что следует из отсутствия дыхания бактерий (Nikitushkin, 2020), отсутствия синтезов белков и РНК (рис. 15А). Можно предположить, что в этой фазе происходят катаболические процессы, в которые вовлечены запасенные в покоящихся клетках эндогенные метаболиты. Поскольку в ПМ было обнаружено значительное количество трегалозы, был изучен ее метаболизм в клетках *Msm* в процессе реактивации ПМ. Как и предполагалось, уровень трегалозы резко снижался в начальный период реактивации (1 - 5 ч) (рис. 15Б), что имело место задолго до начала синтезов РНК (8 - 12 ч) (рис. 17А), при этом наблюдалось резкое повышение концентрации глюкозы, что, по-видимому, связано с гидролизом трегалозы и образованием свободной глюкозы. Дальнейшее снижение содержания глюкозы (рис. 15Б) скорее

всего обусловлено ее утилизацией в путях метаболизма, скорее всего, в гликолитическом пути. В период до 20 ч деление клеток отсутствовало (оценивали по увеличению ОП и КОЕ) (рис. 15А, 18А).



Поскольку гидролиз трегалозы осуществляется ферментом трегалазой, была оценена активность этого фермента в процессе реактивации. Действительно, в начале реактивации (через 2 часа) происходит значительное увеличение активности трегалазы (рис. 16А), что коррелирует со скачком концентрации глюкозы и быстрым снижением концентрации трегалозы (рис. 15Б). Затем активность трегалазы снижалась и через 5-7 часов снова увеличивалась. Третий подъем активности трегалазы через 24 ч (рис. 16А) совпал с началом размножения микобактерий (рис. 15А) и эта активность в дальнейшем поддерживалась на постоянном уровне в течение логарифмической фазы роста.

Для объяснения выявленной флуктуации в активности трегалазы, последняя была изучена в экстрактах активных и покоящихся микобактерий *in vitro*. Для этого определяли влияние широкого диапазона концентраций АТФ на активность трегалазы, полученной из активных и покоящихся клеток микобактерий. Было обнаружено, что небольшие концентрации АТФ (2 мМ) предотвращают активацию этого фермента в экстракте из ПМ (рис. 16Б). При этом на трегалазу из активных микобактерий эти концентрации АТФ не действовали, и ее активность ингибировалась только в присутствии 20 мМ АТФ. Таким образом, флуктуации в активности трегалазы при реактивации покоящихся микобактерий можно объяснить активацией этого фермента, связанной с флуктуациями концентрации внутриклеточного АТФ. Действительно, было обнаружено, что при повышении уровня АТФ в первые 2 ч реактивации снижается активность трегалазы и наоборот (рис. 16А). Когда начинается активный рост (24 ч) трегалаза утрачивает чувствительность к низким концентрациям АТФ, аналогично ситуации с трегалазой из активно растущих бактерий.

Таким образом, можно предположить, что такая чувствительность трегалазы в покоящихся микобактериях к низким концентрациям АТФ обеспечивает поддержание внутриклеточной концентрации АТФ на низком и постоянном уровне в период покоя по механизму обратной связи. Так, если концентрация АТФ сильно снижается (становится ниже, чем 2 мМ), то она восполняется за счет гидролиза трегалазы с образованием глюкозы и далее АТФ, предположительно, за счет субстратного фосфорилирования в гликолизе, ферменты которого нами обнаружены в полном составе в протеомном профиле покоящихся микобактерий. И наоборот, когда уровень АТФ достигает определенного предела (> 2 мМ), а условия для дальнейшей реактивации не благоприятны, происходит ингибирование трегалазы, и снижение уровня АТФ до поддерживающих значений. Такой механизм обратной связи может регулировать энергетические потребности ПМ и минимальный уровень метаболизма в условиях длительного хранения при отсутствии синтеза АТФ при окислительном фосфорилировании.

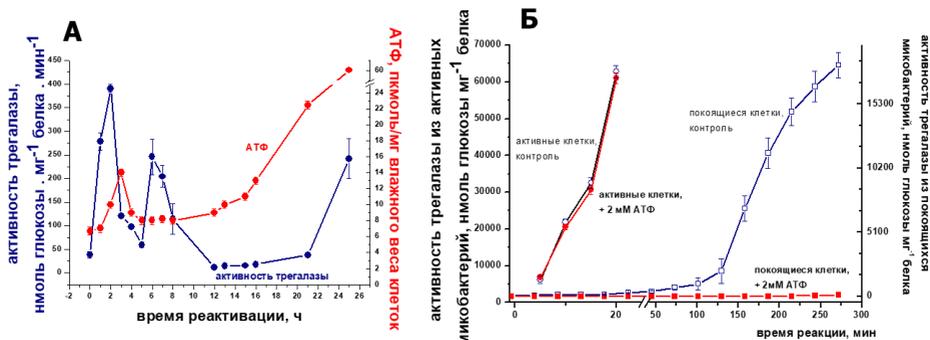


Рис. 16. Активность трегалазы и уровень АТФ. А) Динамика изменения активности трегалазы и концентрации АТФ в реактивирующихся клетках *Msm* из состояния покоя. Б) Способность трегалазы из покоящихся микобактерий к самоактивации *in vitro*. ● – активность трегалазы из активно растущих микобактерий, ■ – активность трегалазы из покоящихся микобактерий; открытые символы – без АТФ, закрашенные символы – в присутствии 2 мМ АТФ в реакционной смеси.

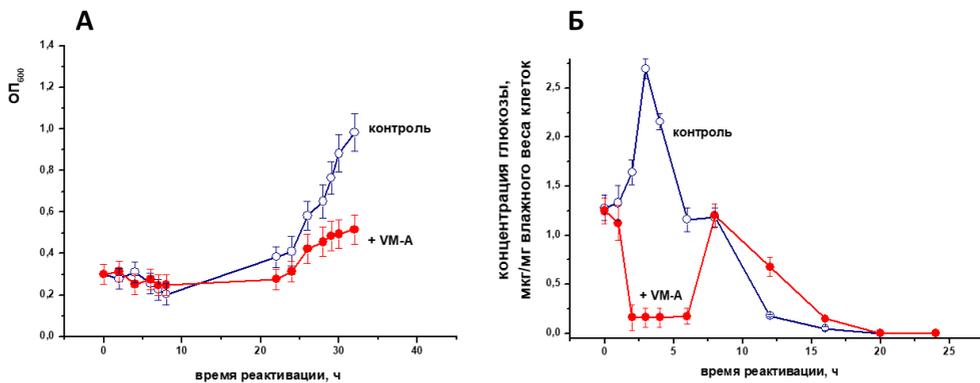


Рис. 17. В присутствии валидамицина А (VM-A) происходит снижение уровня глюкозы на ранней стадии реактивации (Б) и торможение перехода бактерий в активное состояние (А).

Для подтверждения роли трегалазы в процессе реактивации микобактерий использовали ингибитор этого фермента – валидамицин А. В результате наблюдалось существенное торможение реактивации покоящихся «некультивируемых» форм *Msm* (рис. 17А). При этом в

присутствии валидамицина резко снижался внутриклеточный уровень глюкозы, тогда как в контроле уровень глюкозы резко возрастал (рис. 17Б).

Таким образом, доказана биологическая роль расщепления запасенной трегалозы на ранних стадиях реактивации ПМ, гидролизующая ее трегалаза может рассматриваться в качестве мишени для создания антитуберкулезных средств.

3.4.2. Факторы реактивации липидной природы.

Ранее было продемонстрировано, что реверсия к росту длительно хранившихся стационарных культур *Mtb* можно индуцировать внесением в среду роста фосфолипидов (Zhang et al., 2001). Однако в цитируемой работе не был описан механизм действия липидов. Нами было исследовано действие фосфолипидов различного состава на реактивацию НК *Msm*. В этих экспериментах были использованы «некультивируемые» формы бактерий, полученные при выращивании на среде, не содержащей солей калия [Shleeva, 2004], которые были способны к реактивации только в присутствии индукторов реактивации (супернатанты или белки Rpf). В этой модели наблюдали более быстрое образование «некультивируемых» клеток, которые не были способны длительно поддерживать жизнеспособность в состоянии покоя и самостоятельно ревертировать к росту в свежей среде. Их реверсия к росту под действием индукторов характеризовалась замедленной фазой реактивации (начало синтеза РНК) по сравнению с формами, полученными при закислении среды роста, что позволило детально изучить раннюю стадию реактивации. Было обнаружено, что добавление в среду фосфатидилхолина (лецитин), кардиолипина и изо-фосфатидилхолина стимулирует реактивацию подобно действию белков Rpf (рис. 18А). Поскольку общими компонентами этих фосфолипидов являются остатки жирных кислот, было изучено действие свободных жирных кислот (СЖК) на процесс реактивации НК клеток *Msm*. В этих экспериментах ПМ, полученные при лимите K^+ , переседали в свежую жидкую среду Сотона, содержащую ионы калия и добавляли определенное количество липидов, влияние которых на реактивацию клеток оценивали методом НВЧК.

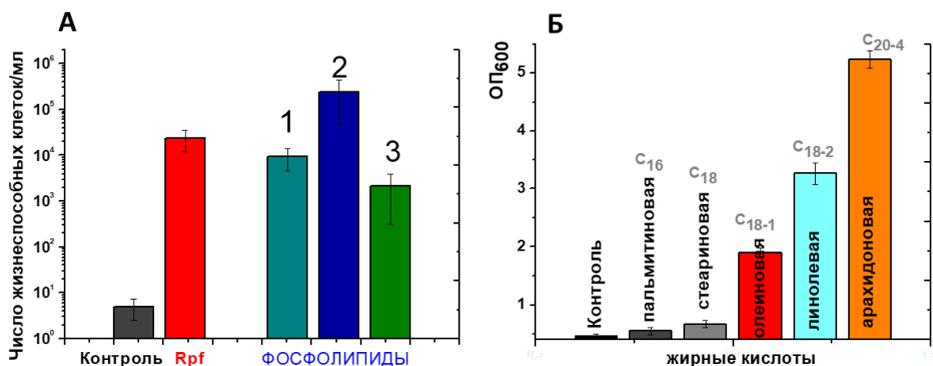


Рис. 18. Реактивация «некультивируемых» клеток *Msm* с использованием липидов. А – фосфолипидами: контроль – реактивация НК в жидкой среде без стимулирующих добавок; Rpf - реактивация НК в жидкой среде в присутствии 5 нг/мл белка Rpf, 1-3 добавление к среде реактивации 200 мкг/мл фосфолипидов: 1 – фосфатидилхолина, 2 – кардиолипина, 3 – лизо-фосфатидилхолина. **Б - жирными кислотами** (в концентрации 1 мкг/мл): контроль – реактивация НК в жидкой среде без стимулирующих добавок.

При добавлении различных СЖК в концентрации 3.5 мкМ в среду, содержащую 10⁶ клеток/мл, находящихся в «некультивируемом» состоянии, было показано, что наибольший стимулирующий

эффект был выявлен при действии свободных ненасыщенных жирных кислот (СНЖК) (рис. 18Б). Влияние фосфолипидов и СНЖК на реактивацию зависело от их концентрации.

Отметим, что интервал действующих концентраций олеиновой кислоты (1.8 – 10.6 мкМ) находится в области более низких концентраций, по сравнению с фосфолипидами (7.5 – 36.6 мкМ), что указывает на роль именно СНЖК в реактивации ПМ. При этом фосфолипиды могут быть источником СНЖК за счет действия бактериальных фосфолипаз и эстераз.

3.4.3. Вовлечение цАМФ в реактивацию покоящихся микобактерий.

Известно, что одним из регуляторных белков микобактерий, который реагируют на присутствие ЖК во внешней среде, является аденилатциклаза. Известны гены, кодирующие этот белок (γ *Mtb* - *Rv2212*, а γ *Msm* - *MSMEG_4279*). По-видимому, олеиновая кислота активирует этот фермент, что может приводить к увеличению концентрации цАМФ в клетке.

Так, экспериментально было обнаружено, что в лаг-фазе, через 24 ч с начала реактивации в присутствии олеиновой кислоты, уровень внутриклеточного цАМФ возрастал (рис. 19А). Внесение в среду цАМФ (1.5–3.0 мМ) также приводило к стимуляции реактивации ПФ *Msm*, подобно действию СНЖК (рис. 19Б). Экспериментально было показано, что при реактивации ПМ в присутствии олеиновой кислоты или цАМФ, активация метаболизма, которую оценивали по скорости включения в клетки радиоактивно меченного урацила происходит через 48 часов, предшествуя делению, которое начинается после 72 часов культивирования (рис. 19Б).

Таким образом, процесс реактивации может быть разделен на три этапа (рис. 19А): лаг-фаза (I), включающая метаболизм трегалозы; метаболическая реактивация (II), на которой происходит повышение уровня цАМФ, начало синтеза РНК (рис. 19) и этап начала деления реактивированных клеток (III). Таким образом, в процессах реактивации ПМ в лаг-фазе вначале активируется трегалаза, затем на втором этапе активируется аденилатциклаза, повышается уровень цАМФ, как следствие, в клетке начинается синтез нуклеиновых кислот и активация других звеньев метаболизма, что обуславливает начало деления клетки.

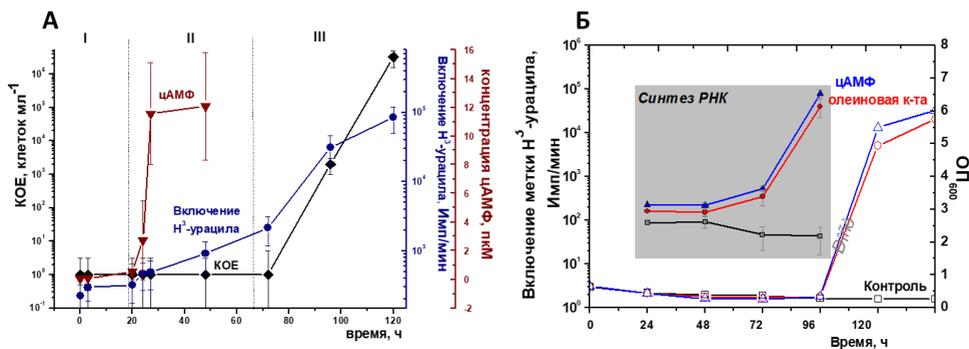


Рис. 19. Начальные этапы реактивации НК *M. smegmatis*. **А** - изменение уровня цАМФ внутри клетки и изменения в оптической плотности культуры при реактивации ПФ *M. smegmatis* в присутствии 10.6 мкМ олеиновой кислоты. **Б** - реактивация НК *Msm* в присутствии 3.5 мкМ олеиновой кислоты или 3 мМ цАМФ. Контроль – без внесения добавок. На врезке скорость включения радиоактивной метки урацил-НЗ.

Аналогичные закономерности были выявлены при реактивации «некультивируемых» покоящихся овидных форм *Mtb*, полученных при адаптации стационарных клеток к постепенному подкислению ростовой среды. Как и в вариантах с *Msm*, реактивация «некультивируемых» клеток *Mtb* была вызвана добавлением экзогенной олеиновой кислоты

(оптимальная концентрация около 10 мМ) или дибутирил-цАМФ (рис. 20). Это позволяет предположить, что механизм ЖК-зависимой реактивации покоящихся форм *Mtb* может быть аналогичен *Msm*.

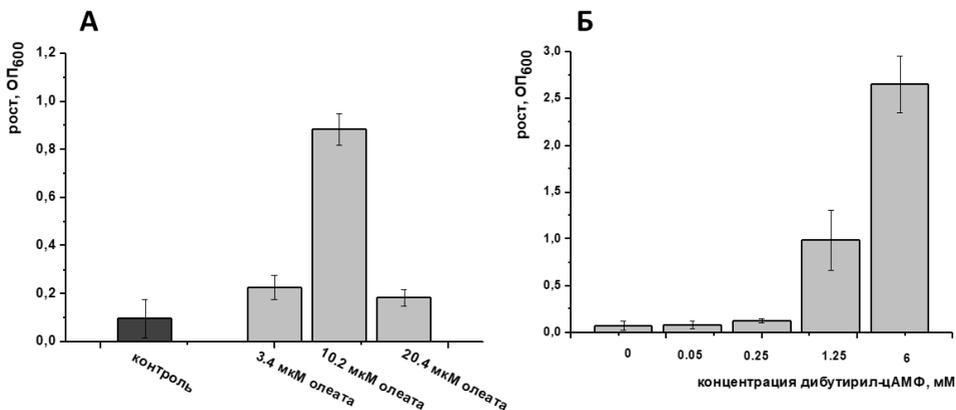


Рис. 20. Индуцированная жирными кислотами (А) и дибутирил-цАМФ (Б) реактивация «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*. ПМ были инокулированы до исходного OD₆₀₀ = 0,2 и реактивированы в колбах. OD 600 измеряли после реактивации в течение 20 дней (А) или 25 дней (Б). Бары представляют стандартное отклонение.

Роль аденилатциклазы в индуцированной ЖК реактивации покоящихся «некультивируемых» клеток была подтверждена в исследованиях мутанта *Msm* ΔАЦ с делетированным геном *MSMEG_4279*. Этот штамм образовывал покоящиеся НК клетки, которые оказались неспособны к реактивации в присутствии олеиновой кислоты, в отличие от штамма дикого типа. Однако в присутствии 3мМ цАМФ, после 11 сут культивирования клетки восстанавливали способность к росту в жидкой среде (рис. 21). Отметим, что штамм *Msm* с гиперэкспрессией этого гена (*pmindAc*) был неспособен образовывать НК ПФ в тех же условиях, что указывает на важность аденилатциклазы *MSMEG_4279* в регуляции образования ПМ.

Последующие процессы, которые связывают повышение концентрации цАМФ с реактивацией микобактерий, пока не ясны. У *Mtb* хорошо описаны два цАМФ-ассоциированных транскрипционных фактора CRPmt и Cmr (Bai et al., 2011). Оба фактора участвуют в регуляции ряда биологически важных метаболических путей, включая дыхание, метаболизм жирных кислот и углеводов (Bai et al., 2011).

3.4.4. Влияние гиперэкспрессия аденилатциклазы Rv2212 и цАМФ-зависимого транскрипционного фактора Rv3676 *M. tuberculosis* на жизнеспособность бактерий, реактивацию из покоящегося состояния и их вирулентность у мышей

В клетках *Mtb* гомологом фермента MSMEG_4279 является аденилатциклаза Rv2212, которая считается основным продуцентом цАМФ среди 16 биохимически активных АЦ-кодирующих генов, присутствующих в геноме (Knapp and McDonough, 2014a; Motaal et al., 2006). цАМФ оказывает плейотропное действие на клеточный метаболизм. В частности, цАМФ-зависимый фактор транскрипции Rv3676 семейства Crp связывается с промоторной областью гена, кодирующего RpfA (белок, который участвует в реактивации покоящихся микобактерий) и регулирует экспрессию гена RpfA в *Mtb* (Knapp and McDonough, 2014).

Мы предположили, что АЦ Rv2212, подобно MSMEG_4279, а также цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (цАМФ-ТФ) Rv3676, способствуют сохранению активного

метаболического состояния *Mtb* в стрессовых условиях и участвуют в реактивации покоящихся бактерий вследствие увеличения продукции внутриклеточного цАМФ. Для изучения влияния АЦ и цАМФ-ТФ на рост и реактивацию ПФ *Mtb* были сконструированы штаммы (pMindRv2212 и pMindRv3676) с гиперэкспрессией генов АЦ и цАМФ-ТФ CRP под контролем тетрациклинового промотора. В экспериментах было показано, что штамм pMindRv2212 обладает статистически значимым увеличением уровня внутриклеточного цАМФ в экспоненциальной фазе по сравнению с контрольным штаммом, содержащим «пустой» вектор pMind.

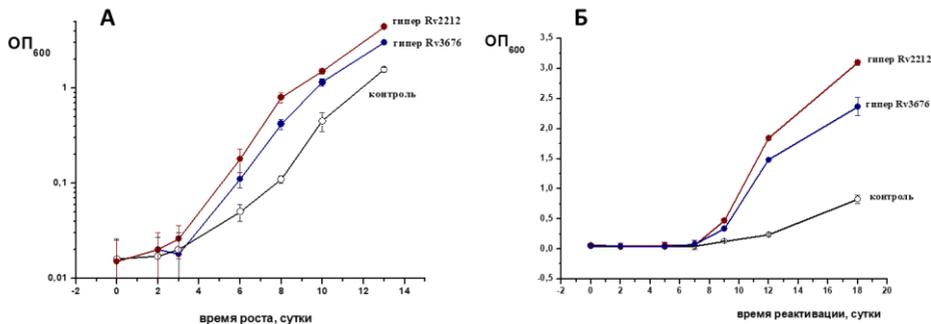


Рис. 21. Рост (А) мутантных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и реактивация (Б) покоящихся микобактерий *in vitro*.

Полученные штаммы росли быстрее, чем бактерии контрольного штамма, на стандартных средах *in vitro* в условиях низкодозового засева, продуцируя повышенный уровень цАМФ в варианте с АЦ (рис. 21). При реактивации полученных ПМ в штаммах с гиперэкспрессией целевых генов отмечалась значительно укороченная лаг-фаза и более быстрая реактивация по сравнению с контрольным штаммом, что подтверждает участие АЦ Rv2212 и цАМФ-ТФ Rv3676 в этом процессе. Совокупность данных, полученных *in vitro* свидетельствовала, что клетки штаммов с гиперэкспрессией аденилатциклазы и цАМФ-ТФ обладают повышенной жизнестойкостью по сравнению с клетками дикого типа.

Для изучения влияния повышенной экспрессии Rv2212 и Rv3676 на характеристики туберкулезной инфекции *in vivo*, мышей двух инбредных штаммов, генетически устойчивых к ТБ (линия B6) и гиперчувствительных к ТБ (I/St), инфицировали бактериями штаммов pMindRv2212, pMindRv3676 и pMind. Оказалось, что повышенный уровень экспрессии обоих генов стимулировал размножение микобактерий в легких как чувствительных (I/St) к ТБ мышей, так и в легких устойчивых (B6) животных (рис. 22А). В соответствии с результатами оценки КОЕ микобактерий, кривые смертности, полученные для мышей B6, продемонстрировали, что штамм pMindRv2212 был гораздо более вирулентным по сравнению с контрольным штаммом (рис. 22Б). При высевах из органов было обнаружено, что колонии штаммов с гиперэкспрессией изучаемых генов были заметно больше по сравнению с колониями контрольного штамма.

Таким образом, повышенная экспрессия аденилатциклазы или цАМФ-зависимого транскрипционного фактора приводит к стимулированию роста *Mtb* в неблагоприятных условиях и более быстрой реактивации бактерий из покоящегося состояния. Последнее приводит к повышенной вирулентности *Mtb* для мышей, очевидно, за счет торможения перехода в покоящееся состояние и поддержания патогена в активно размножающемся состоянии.

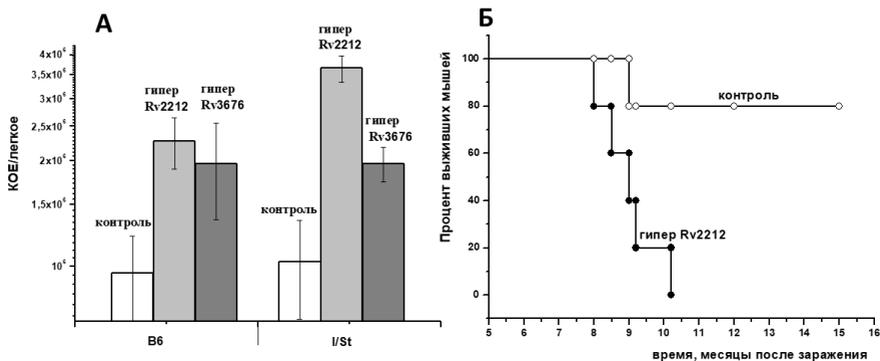


Рис. 22. Рост мутантных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и их вирулентность *in vivo*.

Повышенная концентрация продукции цАМФ вследствие активации АЦ Rv2212 увеличивает продукцию RpfA посредством цАМФ-ТФ Rv3676. Как правило, эти реакции играют «антипокоящуюся» роль, поддерживая активное состояние *Mtb* в неблагоприятных условиях в культуре *in vitro* и размножение внутри хозяина *in vivo*.

3.4.5. Связь между жирными кислотами, цАМФ и белками Rpf в реактивации покоящихся микобактерий.

Известно, что белки семейства Rpf участвуют в реактивации покоящихся «некультивируемых» микобактерий (Shleeva, 2002) и являются пептидогликангидролазами (Kana and Mizrahi, 2010). Поэтому было важно определить, связаны ли каким-либо образом ЖК-цАМФ- и Rpf-зависимая реактивации. Чтобы ответить на этот вопрос, были проведены эксперименты по ЖК-индуцируемой реактивации в присутствии предполагаемых ингибиторов Rpf нитрофенилтиоцианатов (НФТ), которые были синтезированы в лаборатории В. А. Макарова. Белки Rpf обычно очень нестабильны и быстро инактивируются после выделения (Mikamolova et al., 2006). Для решения проблемы стабильности Rpf были использованы два разных рекомбинантных белка Rpf, которые обладают довольно высокой стабильностью, растворимостью и сохранением активности в течение более длительного периода времени, чем нативный Rpf. Для этого были взяты (1) укороченная форма Rpf *M. luteus*, в которой отсутствуют последние 89 аминокислотных остатков С-концевой части (Rpf Sm), и (2) ранее описанная укороченная форма Rpf B (Δ DUF RpfB) (Ruggiero et al., 2009). Было обнаружено, что четыре из пяти первоначально протестированных соединений НФТ (I) - (IV) и (IX), ингибировали муралитическую активность обоих белков в диапазоне концентраций 1–7 мкг/мл (Табл.5). Биологический эффект соединений НФТ был изучен в экспериментах с штаммом *M. luteus*, содержащем единственный ген *rpf*, необходимый для роста этих бактерий (Mikamolova et al., 2002), и являющемся хорошим модельным организмом для изучения ингибиторов Rpf. Семь из десяти протестированных соединений ингибировали рост *M. luteus* в жидкой среде (MIC составлял от 1 до 10 мкг/мл) (Табл. 5). Добавление НФТ, кроме (I), (II) и (VIII), значительно подавляло реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm* (рис. 23). Наблюдаемый ингибирующий эффект зависел от концентрации, наиболее активные соединения (III, IV, VII, IX) подавляли реактивацию при концентрациях 0,1–1 мкг/мл, которые не ингибировали рост активных клеток *Msm*.

Таблица 5. Влияние соединений НФТ на рост *M. luteus* и муралитическую активность белков Rpf.

№ вещества	Химическое название	МИК для <i>M.luteus</i> , мкг/мл	Константа ингибирования ($K_{i_{50}}$) гидролиза 4-MUF-3-NAG, мкг/мл	
			Rpf Sm	$\Delta_{\text{Rpf B}}$
I	4-метокси-5-нитро-6-тиоцианатоимидин	НИ	5.3±1.7	НО
II	4-изопропиламино-5-нитро-6-тиоцианатоимидин	НИ	НИ	НИ
III	1,5-динитро-2,4-дитиоцианатобензол	5	1.2±0.7	0.45±0.15
IV	2-нитро-4-(трифторметил) фенилтиоцианат	5	5.3±1.4	НО
V	3-нитро-4-тиоцианатобензонитрил	1–5	5.2±1.1	4.6±2.6
VI	4-ацетил-2-нитрофенилтиоцианат	5	2.2±1.3	1.3±0.7
VII	4-бензоил-2-нитрофенилтиоцианат	1–5	1.9±0.9	1.5±1.3
VIII	3-нитро-4-тиоцианатобензойная кислота	НИ	НИ	НИ
IX	Метилевый эфир 3-нитро-4-тиоцианатобензойной к-ты	5–10	5.6±1.5	0.5±0.1
X	Этиловый эфир 3-нитро-4-тиоцианатобензойной к-ты	10	2.6±1.1	НО

МИК определяли как самую низкую концентрацию, которая подавляла рост бактерий. НИ – нет ингибирования. НО – не определяли

Выявленная корреляция между антиферментативной и антиреактивной активностями, наблюдаемыми для НФТ, делает их привлекательными для использования в изучении механизма действия белка Rpf и его роли в реактивации покоящихся микобактерий.

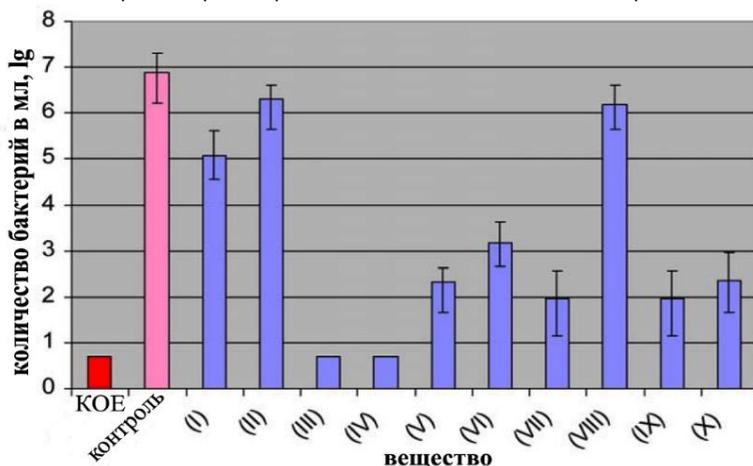


Рис. 23. Влияние соединений НФТ на реактивацию «некультивируемых» клеток *M. smegmatis*. Реактивацию оценивали с помощью анализа НВЧК (розовый и голубые столбцы). Ингибиторы добавляли в количестве 1 мкг/мл в некоторые лунки. Бары представляют (95%) доверительные интервалы для анализа НВЧК. Этот эксперимент повторяли шесть раз. Один типичный эксперимент показан.

Нами было продемонстрировано, что нитрофенилтиоцианаты ингибируют Rpf-зависимую реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm*, индуцированную олеиновой кислотой, и их

последующий рост (рис. 24А). Подобный эффект для НФТ был обнаружен и в вариантах цАМФ - индуцируемой реактивации «некультивируемых» клеток *Msm* (рис. 24Б).

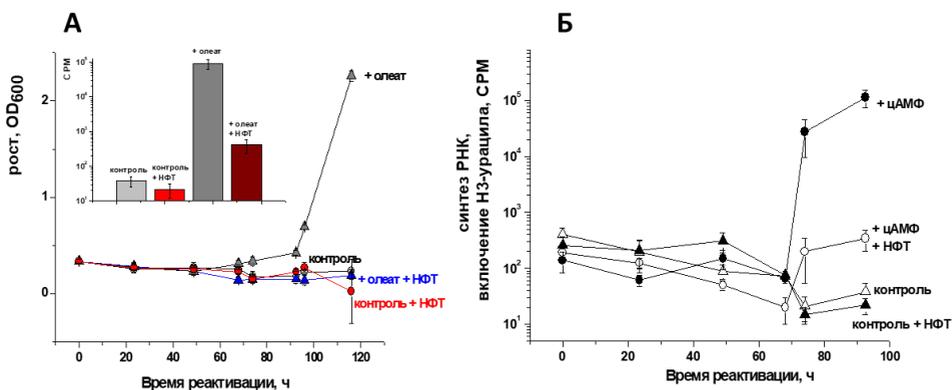


Рис. 24. Индуцируемая олеиновой кислотой реактивация «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* подавляется ингибиторами активности Rpf. ПМ реактивировали в жидкой среде в присутствии и в отсутствие как олеиновой кислоты (3,5 мМ) (А), так и цАМФ (3,0 мМ) (Б) и ингибитора Rpf, НФТ (1 мкг/мл) во всех четырех возможных комбинациях, НФТ добавляли в нулевое время и снова через 48 ч инкубации. Образцы периодически отбирали для определения ОП600 (А) и оценки метаболической активности с использованием включения 3Н-урацила (Б). Вставка к части А показывает уровень включения урацила в четырех культурах, измеренный после 92 ч инкубации. Бары представляют стандартное отклонение.

Важно отметить, что в этих экспериментах НФТ применяли в концентрациях, которые не влияли на рост активно растущих клеток *Msm*. Эти эксперименты демонстрируют, что ЖК-индуцированная реактивация «некультивируемых» клеток *Msm* связана с белками семейства Rpf. Отметим, что реактивирующиеся микобактерии, инкубированные в присутствии НФТ и олеата, показали достоверное увеличение включения урацила (см. вставку в рис. 24А). Очевидно, соединения НФТ меньше воздействовали на фазу активации метаболизма при реактивации, а предотвращали собственно деление клеток.

Нормализация включения урацила на одну жизнеспособную клетку дает значения 900–1000 импульсов в минуту на 10³ клеток для активно делящихся бактерий экспоненциальных культур и 1500–2000 импульсов в минуту на 10³ жизнеспособных клеток, присутствующих после реактивации «некультивируемых» клеток при добавлении НФТ в течение 92 ч (количество жизнеспособных клеток оценивали методом НВЧК). Сходство двух значений указывает на то, что индукция олеиновой кислотой приводит к активации метаболизма в покоящихся клетках, в то время как ингибирование активности Rpf предотвращает их размножение, но не активацию метаболизма.

Также было выяснено, сопровождается ли повышение внутриклеточной концентрации цАМФ, наблюдаемое в результате экзогенного введения СНЖК, повышенной экспрессией генов *rpf* в течение лаг-фазы реактивации. Был проведен анализ уровня экспрессии соответствующих генов методом количественного ПЦР в реальном времени с использованием равных количеств общей РНК, выделенной из клеток, находящихся на разных этапах реактивации. Как и ожидалось, количество РНК, выделенной из «некультивируемых» бактерий, было намного ниже, чем количество, полученное из активно размножающихся клеток. В условиях реактивации в присутствии СНЖК уровни экспрессии трех из четырех генов *rpf* *Msm* существенно не менялись в течение первых 48 ч инкубации. Между 48 и 67 часами уровень экспрессии *MSMEG_5700* (*rpfA*) не изменился, тогда как для *MSMEG_5439* (*rpfB*) и *MSMEG_4643* (*rpfF*) уровни экспрессии были

слегка понижены (Рис. 25). Через 67 часов, в ранней логарифмической фазе, для *rpfA* было выявлено значительное увеличение уровня экспрессии, тогда как уровни экспрессии *rpfB* и *rpfE* демонстрировали незначительные изменения (Рис. 25). В контрольной культуре ПМ (без добавления СНЖК) количество копий генов *rpfA*, *rpfB* и *rpfE* оставалось постоянным в течение всего эксперимента. Эти эксперименты, наряду с результатами, полученными с применением НФТ, демонстрирует, что в процесс реактивации ПМ в присутствии ЖК вовлечен белок Rpf, необходимый для полноценного размножения микобактерий.

Из трех генов *rpf*, оцененных в этом исследовании, *rpfA* был единственным, который показал усиленную экспрессию во время реактивации ПМ. Rickman с соавторами (Rickman et al., 2005) предположили, что цАМФ-зависимый транскрипционный фактор Rv3676, контролирующий экспрессию гена *rpfA*, может контролировать реактивацию покоящихся клеток *Mtb*. Отметим, что у *Corynebacterium glutamicum* ген *rpf2* (гомолог *rpfB* у *Mtb*) также находится под положительным контролем цАМФ-зависимого регулятора транскрипции GlxR, который является гомологом Rv3676 (Jungwirth et al., 2008). В наших экспериментах было обнаружено, что добавление ингибитора Rpf - НФТ предотвращает реактивацию «некультивируемых» клеток *Msm* в присутствии олеиновой кислоты (рис. 26А), что подтверждает участие Rpf в ЖК-индуцированной реактивации микобактерий. Наблюдаемая активация транскрипции *rpfA* (рис. 25) свидетельствует в пользу возможной связи между активацией АЦ и экспрессией по меньшей мере одного из белков Rpf, вероятно, через один из двух гомологов Rv3676 в *Msm* (MSMEG_6189, 97 % идентичности или MSMEG_0539, 91% идентичности). Однако активация экспрессии *rpfA* происходила одновременно с началом размножения клеток, которое наблюдалось через некоторое время после увеличения внутриклеточного уровня цАМФ (рисунки 19А и 25). Действительно, секреция белков Rpf в культурах *Msm* наблюдалась в фазе активного роста, но не в лаг-фазе (Shleeva et al., 2004).

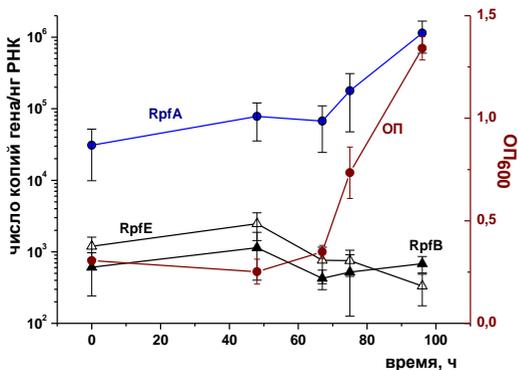


Рис. 25. Профили экспрессии трех генов *rpf* *M. smegmatis* во время индуцированной олеиновой реактивации «некультивируемых» клеток. Олеиновую кислоту добавляли в концентрации 3,5 мкМ. Бары представляют стандартное отклонение. Значение между уровнем экспрессии MSMEG_5700 после 67 ч инкубации было оценено с помощью ANOVA ($P < 0,05$).

В то же время, ЖК опосредуют свое действие через цАМФ на начальных этапах этого процесса, что приводит к активации клеточного метаболизма (метаболической реактивации), о чем свидетельствует кинетика включения урацила (фаза II, рисунок 19А), и не похоже, что их роль, напрямую связана с активностью Rpf (рис. 25). Олеиновая кислота, которая также может высвобождаться вследствие деградации фосфолипидов, выступает стимулятором аденилатциклазы, что приводит к увеличению концентрации цАМФ в клетке. Каким образом уровень цАМФ регулирует активность генов *rpf*, остается неясным. Возможно, что экспрессия *rpfA* связана с цАМФ-зависимым транскрипционным фактором. Таким образом, реактивация ПФ *M. smegmatis* может происходить под действием разных индукторов как белков Rpf, так и СНЖК. При этом, оба механизма реактивации ПФ *M. smegmatis* являются звеньями одной цепи.

3.4.6. Фрагменты пептидогликана (ФПГ) стимулируют реактивацию покоящихся «некультивируемых» микобактерий.

Ранее было показано, что Rpf способен гидролизовать клеточную стенку *M. luteus* (Mukamolova et al., 2006), но подобная активность в отношении микобактериального пептидогликана (ПГ) не была продемонстрирована. В нашем исследовании способность рекомбинантного Rpf из *M. luteus* (RpfSm) гидролизовать клеточные стенки микобактерий изучали с использованием препаратов флуоресцентно-меченного изолированного ПГ (Mukamolova et al., 2006). Инкубация меченого ПГ из *Msm* в присутствии RpfSm приводила к высвобождению в супернатант флуоресцирующего материала, выявляемого после центрифугирования обработанных клеточных стенок (рис. 26). RpfSm также был способен расщеплять клеточные стенки *Mtb*, однако в меньшей степени, чем клеток *Msm* (рис. 26). Наблюдаемое расщепление ПГ было специфическим, поскольку в присутствии эффективных ингибиторов Rpf (1,5-динитро-2,4-бистиоцианатобензола и 3-нитро-4-тиоцианатофенил-фенилметана) подобный эффект не наблюдался. Продукты гидролиза клеточной стенки в присутствии RpfSm, внесенные в культуры ПМ, стимулировали реактивацию клеток, судя по увеличению отношения НВЧК/КОЕ. Как видно на рис. 27А, этот эффект варьировал от эксперимента к эксперименту, но в среднем разница составляла около двух порядков. Оба анализа - КОЕ и НВЧК, способствуют определению индекса реактивации. В экспериментах по реактивации микобактерий количество реактивированных клеток, полученных после внесения продуктов Rpf-зависимого гидролиза клеточной стенки, было сопоставимо с количеством клеток, полученных в результате инкубирования с RpfSm (рис. 27А).

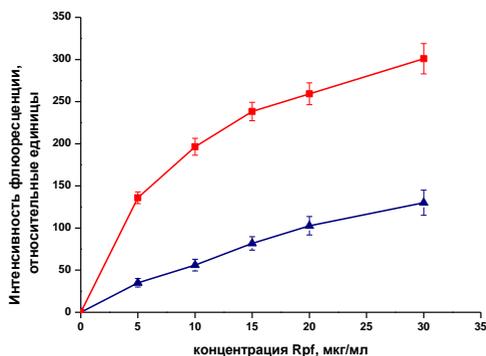


Рис. 26. Гидролиз микобактериального пептидогликана в присутствии Rpf. Красная линия - пептидогликан *Msm*, синяя линия - пептидогликан *Mtb*. К образцам добавляли рекомбинантный RpfSm в различных концентрациях. Уровень гидролиза оценивали путем измерения появления флуоресценции FITC в супернатанте (возбуждение = 496 нм; испускание = 525 нм) после центрифугирования.

Отметим, что эта стимуляция была специфичной для фрагментов ПГ, так как микобактериальный арабиногалактан не стимулировал реактивацию (рис. 27А). Максимальный эффект при реактивации с помощью фрагментов ПГ был обнаружен в довольно узком диапазоне концентраций этих фрагментов (около 0,1 мкг/мл) (рис. 27Б). Аналогичные эффекты фрагментов ПГ наблюдались для реактивации покоящихся форм *Mtb* (рис. 28) при оптимальной концентрации фрагментов около 0,2 мкг/мл. Фрагменты ПГ стимулировали не только процесс реактивации, но также скорость роста ослабленных клеток *Mtb*.

Несмотря на обширную информацию о белке Rpf, оставалось неясным, как его ферментативная активность стимулирует реактивацию покоящихся микобактерий. Один из возможных механизмов заключался в способности Rpf непосредственно участвовать в заключительном этапе деления клетки, разделяя соседние клетки при ограниченном гидролизе ПГ. В пользу этого предположения говорит факт дезагрегации клеточных агрегатов при добавлении Rpf к культурам *Msm* и *M. luteus* (Nikitushkin et al., 2011). Однако этот эффект наблюдался при значительно более высоких концентрациях Rpf, чем используемых для стимуляции реактивации. Стоит также отметить, что концентрации клеток, использованные в этих экспериментах, также были намного выше, чем в опытах по реактивации.

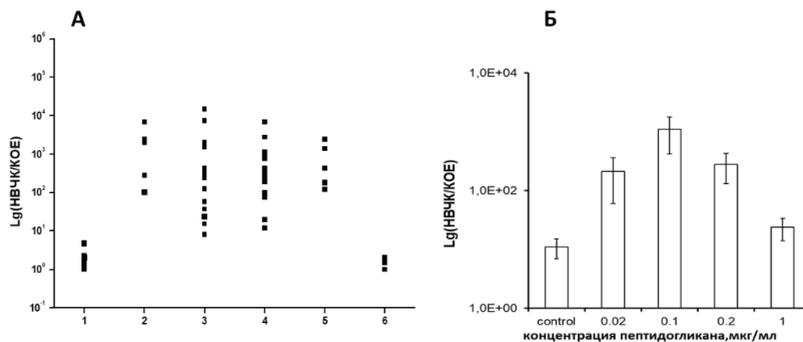


Рис. 27. Влияние продуктов Rpf-зависимого гидролиза микобактериального пептидогликана на реактивацию «некультивируемых» *M. smegmatis*. **А**) 1 - контроль - самореактивация (без добавок), реактивацию стимулировали добавлением следующих индукторов: 2 - RpfSm (5 нг/мл), 3 - фрагменты пептидогликана, полученные в результате обработки микобактериального ПГ с помощью RpfSm (100 нг / мл), 4, 5 - механически разрушенный микобактериальный ПГ (обработанный ультразвуком ПГ, 100 и 200 нг / мл), 6 - арабиногалактан (100 нг/мл). Каждая точка на графике представляет результаты одного отдельного эксперимента. **Б**) Зависимость количества реактивированных клеток *M. smegmatis* от концентрации ПГ. Бары представляют (95%) доверительные интервалы для индекса реактивации (MPN/CFU). Статистические различия между 0.02 и 0.1 мкг/мл, 0.1 и 0.2 мкг/мл, 0,2 и 1 мкг/мл являются значимыми ($P < 0,05$).

Другое предположение относительно участия Rpf в реактивации ПМ состоит в его косвенном действии, за счет гидролиза ПГ бактериальных клеток и высвобождения активных продуктов гидролиза. Образовавшиеся при гидролизе ПГ муропептиды служат триггером для последовательных событий, в конечном итоге приводящих к реактивации ПМ. Эта гипотеза получила подтверждение после открытия способности спор *Bacillus subtilis* прорастать под влиянием высвобожденных муропептидов в супернатанте (Shah et al., 2008; Dworkin and Shah, 2010). Было высказано предположение, что механизм прорастания включает мембраносвязанную Ser / Thr киназу PrkC, содержащую домен PASTA, который, как полагают, связывает фрагменты пептидогликана для активации киназы и передачи сигнала (Jones and Dyson, 2006). У микобактерий имеется гомолог PrkC - протеинкиназа PknB, которая также содержит PASTA-связывающие домены. Это сходство привело к предположению, что муропептиды, полученные из ПГ микобактериальных клеток после гидролиза белком Rpf, могут служить «реактивирующими сигналами» (Mukamolova et al., 2006). Однако несмотря на то, что эта идея была сформулирована в ряде публикаций (Keep et al., 2006; Shah et al., 2008; Dworkin and Shah, 2010; Kana and Mizrahi, 2010; Molle and Kremer, 2010), она не была экспериментально проверена до нашего исследования.

В исследовании Mir с соавт. (Mir et al., 2011) несколько химически синтезированных муропептидов были изучены в отношении стимуляции реактивации покоящихся культур *Mtb*. В этом исследовании был продемонстрирован очень слабый реактивирующий эффект для двух типов муропептидов с максимальной аффинностью к экстрацитоплазматическому домену PknB. Кроме того, было обнаружено, что это взаимодействие имеет относительно слабую (микромоллярную) аффинность (Mir et al., 2011), аналогичную аффинности, определенной для отдельных муропептидов к PrkC *B. subtilis* (Lee et al., 2010). С другой стороны, довольно узкий диапазон действующих концентраций фрагментов ПГ, обнаруженных в настоящем исследовании, может объяснить незначительную стимулирующую реактивацию активность отдельных

муропептидов, продемонстрированную в исследовании (Mir et al., 2011), в котором использовалась только одна концентрация муропептидов. Кроме того, в этой работе были использованы моносахарид-олигопептиды (Mir et al., 2011), тогда как в работе (Lee et al., 2010) обнаружили, что минимальным структурным мотивом, необходимым для реактивации спор *B. subtilis*, являются дисахаридные фрагменты ПГ. Таким образом, гипотеза о стимулирующем реактивацию действии продуктов гидролиза Rpf нашла подтверждение в настоящей работе.

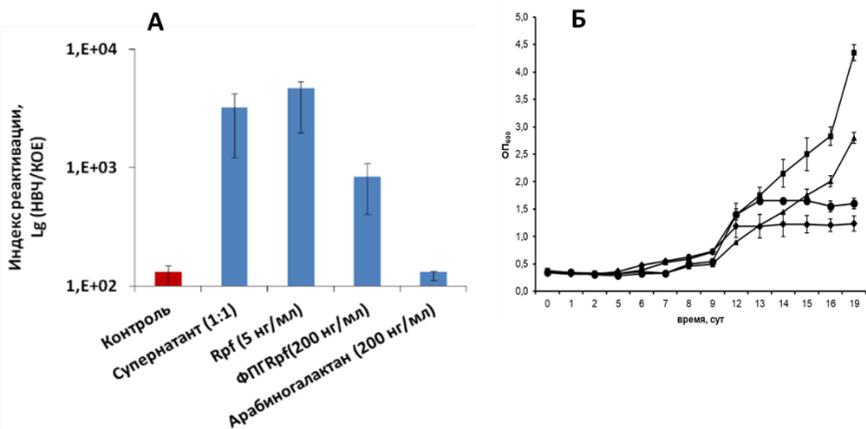


Рис. 28. Влияние продуктов Rpf-зависимого гидролиза микобактериального пептидогликана на реактивацию (А) «некультивируемых» покоящихся клеток *M. tuberculosis* и на рост (Б) стрессированных клеток *M. tuberculosis*. А - 1 - контроль - самореактивация (без индукторов), реактивацию стимулировали внесением следующих веществ: 2 – супернатанта из активных культур, 3- RpfSm (5 нг / мл), 4 - фрагмента пептидогликана, полученного в результате обработки ПГ из *Msm* с помощью RpfSm (200 нг / мл) , 5 - арабиногалактана (200 нг/мл). Б - Ромбы - контроль - самореактивация (без индукторов); фрагменты ПГ из *Msm*: квадраты - 0,2 мкг / мл, треугольники - 2 мкг/мл, кружки - 20 мкг/мл.

3.4.7. Синергическое действие пептидогликангидролаз RpfB и RipA в отношении гидролиза пептидогликана и реактивации «некультивируемых» микобактерий.

Ранее было обнаружено, что RpfB действует не один, а в комплексе с другим внеклеточным белком, взаимодействующим с фактором, промотирующим реактивацию (RipA) (Hett et al., 2007, 2008; Ruggiero et al., 2010; Squeglia et al., 2014). Делеция RipA-ортолога у *Msm* приводила к дефектам при образовании септы во время клеточного деления (Hett et al., 2007). Было обнаружено, что оба белка (RpfB и RipA) локализуются в перегородке делящейся клетки (Hett et al., 2007). RpfB расщепляет гликозидные связи в ПГ клеточной стенки (Cohen-Gonsaud et al., 2005), тогда как, RipA является L,D-эндопептидазой – протеолитическим ферментом, расщепляющим пептидные связи внутри пептидной цепи (гидролизует D-глутамил-мезодиаминопимелиновую кислоту на изоглутамин (D-iGln) и мезодиаминопимелиновую кислоту (m-DAP)) – аминокислоты, которые являются частью поперечных сшивок, необходимых для сохранения ригидности и стабильности пептидогликана (Hett et al., 2008; Squeglia et al., 2014). Однако продукты кооперативной активности белков RpfB и RipA не были идентифицированы. Эксперименты по деградации клеточной стенки проводили на очищенном ПГ из *Msm*, который был маркирован FITC. Оба рекомбинантных белка – RpfB и RipA, отдельно и в комбинации, были проинкубированы с меченым микобактериальным ПГ. Гидролазную активность белков определяли, оценивая количество FITC-меченных продуктов, высвобождаемых в супернатант. Измерения флуоресценции образцов супернатанта в различные моменты времени

демонстрировали медленное увеличение количества меченых продуктов до 100 ч инкубации. Количество высвобождаемых продуктов зависело от концентрации белков, добавляемых в реакционную смесь (рис. 29). Результаты ясно показали, что смесь RpfB и RipA дает самую высокую эффективность гидролиза ПГ (рис. 29).

Для идентификации продуктов синергетического расщепления ПГ использовали MALDI-TOF масс-спектрометрию (МС). МС анализ отфильтрованных гидролизатов ПГ (фильтр с размером пор 3 кДа) из нескольких параллельных экспериментов выявил наличие пика m/z 716,6 (рис. 30). Анализ паттерна фрагментации позволил идентифицировать продукт гидролиза ПГ в присутствии обоих белков, которым оказался N-ацетилглюкозаминил- β (1 \rightarrow 4)-N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат (ангидроГМДП) (рис. 30В).

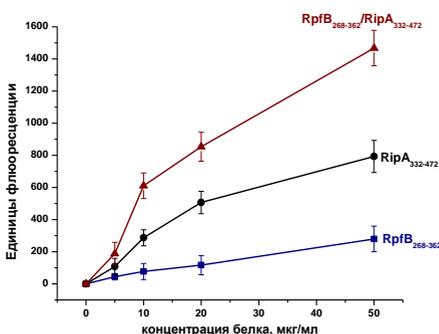


Рис. 29. Ферментативный гидролиз микобактериального ПГ. FITC-меченный ПГ из *Msm* растворяли в реакционном буфере. Рекombинантные RpfB и RipA добавляли к образцам в различных концентрациях. Уровень гидролиза оценивали путем измерения несвязанного флуоресцентного красителя в супернатанте. Для сравнения показана кривая гидролиза в присутствии мутанолизина.

Характер фрагментации идентифицированного продукта (рис. 30В, сверху) соответствовал паттерну фрагментации химически синтезированного ангидроГМДП (рис. 30В, внизу). В обоих случаях были обнаружены фрагменты со следующими соотношениями m/z : GlcNAc – 244; дипептид – 312; дисахаридные фрагменты – 411 и 425; и моносахариддипептид – 513,3 и 497,3. Наблюдаемые массовые различия в исходных соединениях могут быть объяснены тем фактом, что природный ПГ из микобактерий состоит из большого количества гликолил-модифицированных фрагментов мурамовой кислоты.

Таким образом, установлено, что совместное действие ферментов RpfB и RipA приводит к образованию ангидроГМДП. После этого было проведено исследование влияния совместного действия белков RpfB и RipA на реактивацию покоящихся «некультивируемых» клеток микобактерий. Инкубация «некультивируемых» клеток *Msm* в жидкой среде без каких-либо добавок приводила к появлению некоторого количества культивируемых клеток, но только после 160 ч реактивации.

Добавление как отдельных белков (RpfB или RipA), так и их смеси в инкубационную среду значительно стимулировало реактивацию и рост покоящихся бактерий, при этом RipA был более эффективен, чем RpfB ($P < 0,05$) (рис. 31). Усиление реактивации наблюдалось после 160 ч инкубации в присутствии обоих белков по сравнению с арифметическим сложением эффекта (значение КОЕ на оси ординат) каждого белка ($P < 0,01$). Таким образом, первоначально наблюдаемый синергизм в экспериментах по деградации ПГ (рис. 29) также наблюдался и в случае реактивации ПМ (рис. 31). Отметим, что этот результат является первым экспериментальным подтверждением участия RipA в реактивации микобактерий. Добавление синтетического ангидроГМДП к покоящимся бактериям также приводило к стимуляции реактивации «некультивируемых» микобактерий. Зависимость степени реактивации от концентрации ангидроГМДП имела колоколообразную форму с широким диапазоном стимулирующей реактивацию активности от 9 до 225 нг/мл и максимальной активностью в диапазоне концентраций 40-100 нг/мл. Следует отметить, что применение ряда других

муропептидов или их фрагментов, включая моносахарид-дипептид (MurNAc-L Ala-D-isoGlu), аминокептид (L-Ala-D-Glu), аминокислоты [Ala, Glu(n)], GlcNAc, дисахарид (Glc-NAc-MurNAc), в таком же концентрационном диапазоне, как для ангидроГМДП, не приводило к какому-либо стимулированию реактивации «некультивируемых» микобактерий. Этот факт свидетельствует о том, что определенная химическая структура муропептидов, образующихся при совместном действии RpfB и RipA, является важной молекулярной детерминантой в процессе реактивации покоящихся микобактерий.

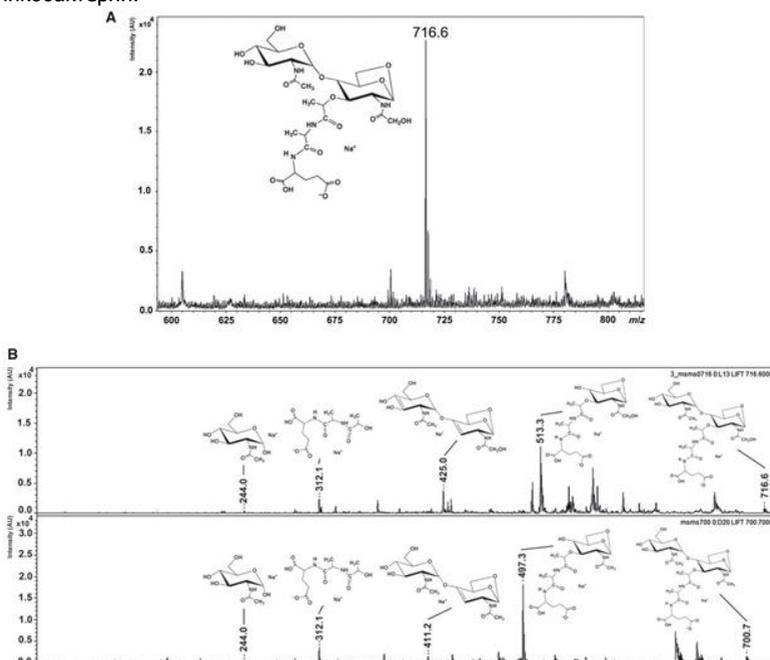


Рис. 30. (А) МС спектры (MALDI) супернатанта, отфильтрованного через 3-кДа фильтр, полученный после гидролиза микобактериального ПГ (из Msm) в присутствии RpfB + RipA (оба по 10 мкг/мл). (В) Спектры фрагментации пиков МС, m/z 716,6 и m/z 700,7. Вверху: фрагментация пика (m/z 716,6), появляющегося при совместном расщеплении ПГ RpfBc и RipA [N-ацетилглюкозаминил- β (1 \rightarrow 4)-N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамат]. Внизу: фрагментация пика для синтетического аналога ангидроГМДП (m/z 700,7).

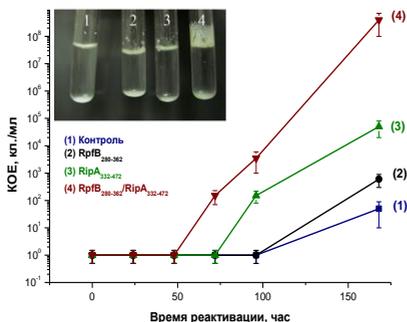


Рис. 31. Реактивация покоящихся «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* в присутствии белков RpfB и RipA, как отдельно, так и в комбинации. Периодически образцы отбирали для подсчета КОЕ. ■ контроль; ●, RpfB, 10 нг/мл, * P < 0,05 по сравнению с контролем через 160 ч; ▲, RipA, 10 нг/мл, ** P < 0,01 по сравнению с RpfB через 160 часов; ▼, RpfB / RipA 10/10 нг/мл, ** P < 0,01 по сравнению с RpfB + RipA через 160 часов. Вставка: пробирки с реактивированной культурой *Msm* после 160 ч реактивации.

Таким образом, было установлено, что в механизме реактивирующего действия Rpf промежуточным звеном является накопление продуктов гидролиза пептидогликана клеточных стенок бактерий – ангидромуропептидов, образование которых происходит в результате совместного действия Rpf с эндопептидазой RipA.

3.4.8. Гипотетическая схема реактивации покоящихся микобактерий

Обобщая полученные данные о процессах, происходящих при реактивации покоящихся микобактерий, мы предлагаем следующую гипотетическую схему процесса реактивации (рис. 32), включающую наличие трех этапов реактивации (рис. 19). Предполагается, что на первом этапе отсутствуют биосинтетические процессы. Все процессы на этом этапе связаны с катаболическими реакциями. В частности, активируется трегалаза, гидролизующая трегалозу с высвобождением глюкозы, повышается уровень АТФ, скорее всего за счет реакций гликолиза, и, возможно, других метаболитов. На втором этапе активируется аденилатциклаза и повышается уровень цАМФ в клетке. Обладая плейотропным эффектом, цАМФ может активировать значительное число реакций, которые в итоге приводят к началу синтеза биомолекул, активации общего метаболизма (3-й этап). Одним из следствий повышения уровня цАМФ является активация цАМФ-ТФ, который стимулирует экспрессию 150 генов, в том числе гена *rpfA* и синтез белка RpfA. Одним из следствий повышения уровня цАМФ является активация цАМФ-ТФ, который стимулирует экспрессию 150 генов, в том числе гена *rpfA* и синтез белка RpfA. Rpf, как литическая трансгликозилаза, может участвовать в ремоделинге клеточной стенки совместно с белком RipA и, в конечном итоге, приводить к делению клеток.

С другой стороны, в результате Rpf/RipA-зависимого процесса деградации пептидогликана образуются секретлируемые в окружающую среду муропептиды, которые могут взаимодействовать с другими бактериальными клетками в популяции и путем активации протеинкиназы PknB, запускать реакцию автофосфолирования с последующей активацией ряда процессов, приводящих в итоге к стимуляции клеточного деления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделируя первичные условия (закисление внешней среды), с которыми сталкивается патоген при попадании в организм хозяина, были получены покоящиеся «некультивируемые» формы микобактерий, обладающие всеми характеристиками, отвечающими понятию покоящихся бактерий, в том числе способные к длительному выживанию в жидких средах без репликации. Важно, что инфицирование мышей полученными формами *Mtb* приводило к развитию длительной (до 1.5 лет) хронической формы ТБ у животных, что моделирует состояние латентного ТБ.

Проведение комплекса экспериментов с использованием полученных покоящихся форм микобактерий позволило выявить особенности биохимического состава ПМ и протекающих в них процессов, а также механизмы, способствующие переживанию длительное время без репликации и функционирующие при реактивации. Так, установлено, что после длительного пребывания в состоянии покоя в микобактериях сохраняется значительное количество стабильных белков, сохраняющих потенциальную ферментативную активность. Все белки, обнаруженные в покоящихся клетках, можно разделить на три группы: 1) белки, которые экспрессируются при переходе от активного состояния в состояние покоя; 2) белки, которые являются «запасенными» и сохраняются в покоящихся клетках, возможно, для дальнейшей реактивации клеток в случае наступления благоприятных условий; 3) белки, которые являются функциональными и могут играть роль в поддержании клеточного метаболизма на достаточном для выживания уровне.

Анализ представленности белков третьей группы и их ферментативной активности позволил предположить, что в состоянии покоя в микобактериях может функционировать гликолитический путь с образованием пирувата, который может превращаться до сукцината в неполном цикле Кребса. Подобный механизм позволяет окислить восстановительные эквиваленты, образованные в гликолитическом пути, и обеспечить синтез АТФ, а за счет электрогенного выброса сукцината генерировать мембранный потенциал.

Другой особенностью ПМ является хорошая представленность белков, ферментных систем защиты от стрессовых факторов и низкомолекулярных соединений, обеспечивающих защиту клетки в период отсутствия репликации. Среди таких механизмов можно выделить три группы. К первой группе относятся ферменты, участвующие в защите от окислительного стресса (деактивация АФК и восстановление окисленных молекул), защите белков (шапероны) и ДНК (гистоны).

Второй защитный механизм связан со значительным накоплением внутриклеточной трегалозы. Очевидно, что трегалоза стабилизирует покоящиеся клетки, о чем свидетельствует прямая корреляция между содержанием трегалозы и жизнеспособностью клеток в период длительного покоя. Кроме этого, трегалоза может рассматриваться как запасенный энергетический субстрат, который расходуется в процессе реактивации ПМ за счет АТФ – зависимого перехода фермента трегалазы из латентного состояния в активное. Обнаруженные особенности накопления и метаболизма трегалозы в ПМ выявляют сходство между полученными формами микобактерий и экзоспорами стрептомицетов и аскомицетовых дрожжей (Arguelles, 2000; Elbein, 2003).

Полученные в работе результаты позволяют предположить наличие в ПМ «остаточного» метаболизма, исключающего биосинтез макромолекул, что способствует поддержанию жизнеспособности клетки в период длительного покоя.

Третий защитный механизм связан накоплением в мембранной фракции покоящихся клеток микобактерий (особенно у *Msm*) этерифицированных (гидрофобных) форм порфиринов, которые могут стабилизировать клеточные структуры, и таким образом способствовать их длительному сохранению в период покоя. В тоже время, обнаруженное явление накопления эндогенных порфиринов в покоящихся микобактериях позволило успешно применить метод фотодинамической инактивации таких форм *in vitro*.

Существенной особенностью ПМ является необходимость процесса реактивации для реверсии к размножению. При исследовании реактивации ПМ было выявлено, что она состоит из трех стадий: I - истинная лаг фаза (связана с катаболическими реакциями), II - метаболическая активация, III – начало размножения клеток.

Было установлено, что в фазе I наблюдается распад трегалозы под действием фермента трегалазы, сопряженный с образованием глюкозы и АТФ. Стадия II связана с началом биосинтетических процессов, включающих синтез цАМФ под действием аденилатциклазы и синтез РНК. На третьей стадии наблюдается начало размножения бактериальных клеток и активный синтез белка RpfA.

Установлена роль внутриклеточного цАМФ в поддержании покоящегося состояния и в реактивации ПМ. Существует критический порог для внутриклеточных концентраций цАМФ (18–20 пмоль на 1 мг влажного веса клеток), ниже которого покоящиеся бактерии приобретают «некультивируемый» фенотип, но даже умеренного увеличения концентраций цАМФ достаточно для реактивации и роста. Выявлена связь между реактивацией ПМ в присутствии свободных ненасыщенных жирных кислот и цАМФ. В результате деградации фосфолипидов хозяина могут высвободиться экзогенные ЖК, которые способны активировать аденилатциклазу микобактерий, что ведет к увеличению концентрации цАМФ в микобактериальной клетке. Повышенная концентрация продукции цАМФ вследствие активации АЦ Rv2212 увеличивает продукцию RpfA, возможно, через цАМФ-ТФ Rv3676. Эти реакции играют «антипокоящуюся»

роль, поддерживая активное состояние *Mtb* в неблагоприятных условиях в культуре и размножение внутри хозяина, что продемонстрировано при изучении мутанта *Mtb* с гиперэкспрессией АЦ Rv2212 и цАМФ-ТФ Rv3676 как *in vitro*, так и *in vivo*. Одним из следствий повышения цАМФ является синтез белка RpfA. Rpf, как пептидогликан-гидролаза, может стимулировать деление клеток как за счет ремоделинга клеточной стенки, так и, возможно, за счет совместного с белком RipA образования муропептидов, играющих сигнальную роль в активации деления клеток.

На основе полученных результатов выявлены новые механизмы образования покоящихся микобактерий, поддержания их жизнеспособности длительное время без репликации и их реактивации, что важно как для фундаментальной так и для медицинской микробиологии.

ВЫВОДЫ

1. Постепенное закисление окружающей среды (pH 8 \longrightarrow 5.8) с последующим хранением в микроаэрофильных условиях приводит к образованию покоящихся форм *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, способных к реактивации *in vitro*.
2. Заражение мышей покоящимися «некультивируемыми» клетками *M. tuberculosis* приводит к развитию хронической/латентной формы туберкулеза *in vivo*.
3. Покоящиеся формы микобактерий характеризуются измененной морфологией, «некультивируемостью» на плотных средах, низким уровнем метаболизма и повышенной устойчивостью к стрессовым воздействиям (антибиотики, температура), а также способностью к длительному выживанию (несколько лет).
4. В состоянии длительного покоя клетки микобактерий содержат значительное количество неповрежденных белков, включая ферменты центрального метаболизма (гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, пентозофосфатный путь); белки, защищающие от окислительного стресса, образования белковых агрегатов и стабилизирующие нуклеиновые кислоты; а также ферменты деградации белков, липидов и нуклеиновых кислот.
5. В покоящихся клетках *M. smegmatis*, а также *M. tuberculosis* в присутствии 5-аминолевулиновой кислоты, происходит значительное накопление эндогенных порфиринов (~ 300 нг/мг влажного веса клеток для *Msm* и 17 нг/мг влажного веса клеток для *Mtb*), что приводит к фоточувствительности покоящихся микобактерий.
6. Покоящиеся клетки микобактерий содержат значительное количество трегалозы (6.5 ± 0.4 мкг/мг влажного веса клеток для *Msm* и 2.2 ± 0.3 мкг/мг влажного веса клеток для *Mtb*), уровень которой определяет жизнеспособность клеток в период длительного выживания в нереплицирующем состоянии. АТФ ингибирует активность трегалазы (гидролизующей трегалозу до глюкозы) в покоящихся клетках *M. smegmatis*, что позволяет регулировать уровень АТФ по механизму обратной связи.
7. Свободные ненасыщенные жирные кислоты и цАМФ стимулируют реактивацию покоящихся «некультивируемых» клеток *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Делеция гена *MSMEG_4279*, кодирующего аденилатциклазу *M. smegmatis* предотвращает подобную реактивацию.
8. Повышенная экспрессия аденилатциклазы Rv2212, а также цАМФ-зависимого транскрипционного фактора Rv3676, приводит к стимулированию роста *M. tuberculosis* в неблагоприятных условиях, более быстрой реактивации бактерий из покоящегося состояния и к их повышенной вирулентности для мышей.
9. Совместное действие белков RipA и Rpf приводит к гидролизу пептидогликана клеточных стенок микобактерий с образованием N-ацетилглюкозаминил- β (1 \rightarrow 4)-N-ацетил-1,6-ангидромурамоил-L-аланил-D-изоглутамата (ангидроГМДП), который обладает реактивирующей активностью по отношению к покоящимся формам микобактерий.

10. Предложена схема реактивации покоящихся микобактерий, включающая метаболизм трегалозы и цАМФ-зависимый синтез белка RpfA.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Trutneva KA, **Shleeva MO**, Demina GR, Vostroknutova GN and Kaprelyans AS (2020) One-Year Old Dormant, "Non-culturable" Mycobacterium tuberculosis Preserves Significantly Diverse Protein Profile. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:26.
2. Nikitushkin, V.D., Trenkamp, S., Demina, G.R., **Shleeva M.O.**, Kaprelyants A.S. (2020) Metabolic profiling of dormant Mycolicibacterium smegmatis cells' reactivation reveals a gradual assembly of metabolic processes. *Metabolomics* 16(2):24.
3. **Шлеева М. О.**, Савицкий А. П., Никитушкин В. Д., Соловьев И. Д., Трутнева К. А., Керученко Я. С., Капрельянец А. С. (2020) Эффект фотодинамической инактивации в отношении покоящихся и активно растущих форм *Mycobacterium smegmatis*. *Прикладная биохимия и микробиология*, том 56, № 3, с. 1–8
4. **Shleeva, M.O.**, Savitsky, A.P., Nikitushkin, V.D., Solovyev ID, Kazachkina NI, Perevarov VV, Kaprelyants AS. (2019) Photoinactivation of dormant *Mycobacterium smegmatis* due to its endogenous porphyrins. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 9687–9695.
5. **Шлеева М. О.**, Кондратьева Т. К., Гончаренко А. В., Апт А. С., Капрельянец А. С. (2019) Зависимый от цАМФ транскрипционный фактор в *Mycobacterium tuberculosis*, кодируемый геном Rv3676, - возможная мишень для создания противотуберкулезных соединений. *Прикладная биохимия и микробиология*. Том: 55 Выпуск: 4 Стр.: 380-385.
6. Trutneva K.A, **Shleeva MO**, Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. (2018) Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology. *Front. Microbiol.*, 9:2083.
7. Demina GR, Nikitushkin VD, **Shleeva MO**, Makarov VA, Riabova OB, Lepioshkin AYu, Kaprelyants AS. (2017) Benzoylphenyl thiocyanates are new, effective inhibitors of the mycobacterial Resuscitation promoting factor B protein. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1):69.
8. **Shleeva MO**, Kondratieva TK, Demina GR, Rubakova EI, Goncharenko AV, Apt AS, Kaprelyants AS. (2017) Overexpression of Adenylyl Cyclase Encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2212 Gene Confers Improved Fitness, Accelerated Recovery from Dormancy and Enhanced Virulence in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:370
9. **Shleeva MO**, Trutneva KA, Demina GR, Zinin AI, Sorokoumova GM, Laptinskaya PK, Shumkova ES, Kaprelyants AS. (2017) Free Trehalose Accumulation in Dormant *Mycobacterium smegmatis* Cells and Its Breakdown in Early Resuscitation Phase. *Front Microbiol.* 8:524
10. Nikitushkin VD, **Shleeva MO**, Zinin AI, Trutneva KA, Ostrovsky DN, Kaprelyants AS. (2016) The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin. *FEMS Microbiol Lett.* т.363, fnw206
11. Nikitushkin VD, Demina GR, **Shleeva MO**, Guryanova SV, Ruggiero A, Berisio R, Kaprelyants AS. (2015) A product of Rpf and Rip joint enzymatic action promotes resuscitation of the dormant mycobacteria. *FEBS Journal*, 282 (13): 2500-11
12. Timofeeva LM, Kleshcheva NA, **Shleeva MO**, Filatova MP, Simonova YuA, Ermakov YuA, Kaprelyants AS. (2015) Nonquaternary poly(diallylammonium) polymers with different amine structure and their biocidal effect on *Mycobacteria tuberculosis* and *smegmatis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (6): 2557-71
13. **Shleeva M**, Kondratieva T, Rubakova E, Vostroknutova G, Kaprelyants A, Apt A. (2015) Reactivation of dormant "non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* developed in vitro after injection in mice: Both the dormancy depth and host genetics influence the outcome. *Microbial Pathogenesis*, 78, p. 63-66
14. **Shleeva M**, Goncharenko A, Kudykina Y, Young D, Young M, Kaprelyants A. (2013) Cyclic AMP-dependent resuscitation of dormant Mycobacteria by exogenous free fatty acids. *PLoS One.* 8(12): e82914.

15. Nikitushkin VD, Demina GR, **Shleeva MO**, Kaprelyants AS. (2013) Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of "non-culturable" mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103 (1): 37-46.
16. Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Ruggiero A., Makarov V.A., Demina G.R., **Shleeva M.O.**, Potapov V.D., Shramko P. A. (2012) Resuscitation promoting factor (RPF). In search of inhibitors. *Protein & Peptide Letters*, 19 (10), 1026-1034.
17. Арцатбанов В.Ю., Вострокнутова Г.Н., **Шлеева М.О.**, Гончаренко А.В., Зинин А.И., Островский Д.Н., Капрельянц А.С. (2012) Влияние окислительного и нитрозативного стрессов на накопление дифосфатных интермедиатов немевалонатного пути синтеза изопrenoидов у корино- и микобактерий. *Биохимия*. 77(4), 461-473.
18. Назарова Е.В., **Шлеева М.О.**, Морозова Н.С., Кудыкина Ю.К., Вострокнутова Г.Н., Ружицкий А.О., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Швец В.И., Капрельянц А.С. (2011) «Роль липидных компонентов в процессах образования и реактивации «некультивируемых» форм *Mycobacterium smegmatis*». *Биохимия*, т. 76 № 6, с. 781-791.
19. **Shleeva MO**, Kudykina YuK, Vostroknutova GN, Suzina NE, Mulyukin AL, Kaprelyants AS. (2011) Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis*, V. 91, № 2, p. 146-154.
20. Кудыкина Ю.К., **Шлеева М.О.**, Арцатбанов В.Ю., Сузина Н.Е., Капрельянц А.С. (2011) Образование покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis* в пост-стационарной фазе при постепенном закислении среды, *Микробиология*, 80 (5), 625-636.
21. Мулюкин А.Л., Кудыкина Ю.К., **Шлеева М.О.**, Анучин А.М., Сузина Н.Е., Данилевич В.Н., Дуда В.И., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. (2010) Внутривидовое разнообразие покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis*. *Микробиология*, т. 79, № 4, с. 486-497
22. **Шлеева М.О.**, Салина Е.Г., Капрельянц А.С. Покоящиеся формы микобактерий. (2010) *Микробиология*. Т. 79. № 1. С. 3-15.
23. Demina GR, Makarov VA, Nikitushkin VD, Ryabova OB, Vostroknutova GN, Salina EG, **Shleeva MO**, Goncharenko AV, Kaprelyants AS. (2009) Finding of the low molecular weight inhibitors of resuscitation promoting factor enzymatic and resuscitation activity. *PLoS One*, 4(12):e8174.
24. Салина Е.Г., Вострокнутова Г.Н., **Шлеева М.О.**, Капрельянц А.С. (2006) Роль межклеточных взаимодействий при образовании и реактивации "некультивируемых" микобактерий. *Микробиология*. Т. 75. № 4. С. 502.
25. Downing KJ, Mischenko VV, **Shleeva MO**, Young DI, Young M, Kaprelyants AS, Apt AS, Mizrahi V. (2005) Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation *in vitro*. *Infect Immun*. 73(5):3038-43.

Патенты:

Тимофеева Л.М., Клещева Н.А., Капрельянц А.С., **Шлеева М.О.** Полидиаллиламмониевые соли в качестве микобактерицидного и туберкулоцидного дезинфицирующего средства. №2009137650 от 13 октября 2009 г, зарегистрирован в ГРИ РФ 10.04.2011.

Материалы конференций (наиболее существенных):

1. M. Shleeva, Yu. Kudykina, A. Kaprelyants. Formation of dormant cells of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* during adaptation to low pH. FEMS 2009. *3rd Congress of European Microbiologists* (Gotenburg, Sweden), 2009.
2. Yu. Kudykina, M. Shleeva, A. Kaprelyants. Mycobacteria produce dormant forms with distinct morphology in response to gradual acidification. 2010. *The 2nd EMBO Meeting* (Barcelona, Spain), p. 35.
3. M. Shleeva, Yu. Kudykina, M. Young, D. Young, A. Kaprelyants. Free fatty acids – new inducers of dormant mycobacterial cell reactivation. 2011. *The 3rd EMBO Meeting* (Vienna, Austria), p. 46.
4. Trutneva K., Shleeva M., Demina G., Kaprelyants A. Proteomic features of dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells with ovoid morphology. FEMS Open Bio, 2018, S1, p.401,
5. Shleeva M., Trutneva K., Shumkov M., Demina G., Kaprelyants A. A major protein Rv0341 in the membrane of dormant *Mycobacterium tuberculosis* binds DNA and reduces the rate of RNA synthesis. FEMS Open Bio, 2018, Volume 8, S1, p.400

6. K. Trutneva, M. Shleeva, G. Demina, A. Kaprelyants. Survival and reactivation of dormant "nonculturable" mycobacteria depends on trehalose content and trehalase activity. *FEBS Journal*, 2017, Volume 284, S1, 374-375.
7. Demina G.R., Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. Stimulation of resuscitation of mycobacterial non-culturable cells by Rpf-derived peptidoglycan fragments. *EMBO Conference Tuberculosis 2012: Biology, pathogenesis, intervention strategies*, Paris, France, September 11-15, 2012. P30
8. Shleeva M.O., Kudykina Yu.K., Goncharenko A.V., Demina G.R., Kaprelyants A.S. The Role of Adenylate Cyclase in Reactivation of Dormant "Non-Culturable" Mycobacteria. *EMBO Conference Tuberculosis 2012: Biology, pathogenesis, intervention strategies*, Paris, France, September 11-15, 2012. P94
9. V.D. Nikitushkin, G.R. Demina, M.O. Shleeva, A. Ruggiero, R. Berisio, A.S. Kaprelyants. New insight into the mechanisms of mycobacterial dormancy control: role of the resuscitation promoting factor interacting protein ripa in the reactivation process. *FEMS 2013*, Leipzig, Germany, July 21-25.
10. G. Demina, M. Shleeva, V. Nikitushkin, O. Ryabova, A. Ruggiero, R. Berisio, A. Kaprelyants. Derivatives of 2-nitrophenyl thiocyanates as the rpf5 inhibitors. *FEMS 2013*, Leipzig, Germany, July 21-25
11. G.R. Demina, M.O. Shleeva, V.D. Nikitushkin, O.B. Ryabova, A.S. Kaprelyants. New Rpf inhibitors suppress reactivation of the *M. tuberculosis* dormant forms. Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia), Москва, 8-12 Сентября, 2013.
12. Shleeva M., Goncharenko A., Kaprelyants A. Involvement of free unsaturated fatty acids and cAMP in dormant *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation. *FEMS 2013*, Leipzig, Germany, July 21-25
13. Shleeva M.O., Goncharenko A.V., Demina G.R., Kaprelyants A.S. Cyclic AMP-dependent reactivation of dormant "non-culturable" mycobacteria. *Skoltech Bio-Med Conference: Toward Therapies of the Future*. May 26-28, 2014.
14. Vadim D. Nikitushkin, Margarita Shleeva, Galina Demina, Svetlana Gurianova, Alessia Ruggiero, Rita Berisio, Arseny Kaprelyants. Mycobacterial cell wall components – oligosaccharide-oligopeptides – are resuscitation inducers of the dormant mycobacteria. *FEBS Journal*. FEBS EMBO, 2014, Paris, France
15. Vadim Nikitushkin, Galina Demina, Margarita Shleeva, Arseny Kaprelyants. Role of lytic transglycosylase Rpf in resuscitation of the dormant mycobacteria. *Skoltech Bio-Med Conference: Toward Therapies of the Future*. May 26-28, 2014.
16. K. Trutneva, M. Shleeva, G. Demina, M. Shumkov, A. Kaprelyants. PadR-like Protein (MSMEG_6227) is a major protein in the membrane of *Mycobacterium smegmatis* dormant cells. *BioMicroWorld2015 - VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*. Barcelona (Spain), 2015, p. 407
17. M. Shleeva, G. Demina, K. Trutneva, D. Ostrovsky, A. Kaprelyants. Free trehalose is accumulated in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and is required for their early resuscitation phase. *EMBO Conference Tuberculosis 2016 "Interdisciplinary research on Tuberculosis and pathogenic mycobacteria"*. 23 September, 2016, Paris, France, p. 253
18. Шлеева М.О., Трутнева К.А., Шумков М.С., Демина Г.Р., Капельянц А.С. Роль ДНК-связывающего PadR-подобного белка в образовании и поддержании покоящегося состояния микобактерий. 1-й Российский Микробиологический Конгресс, 17-18 октября 2017, г. Пушино, стр. 134 -135
19. The role of cAMP-dependent RpfA protein synthesis in the reactivation of dormant mycobacteria. Shleeva M.O., Kondratieva T.K.2, Goncharenko A.V.1, Apt A.S.2, Kaprelyants A.S.1 *FEBS OPEN BIO* Том: 9 Приложение: 1 Стр.: 420, 2019
20. Шлеева М.О., Савицкий А.П., Никитишкин В.Д., Соловьев И.Д., Казачкина Н.И., Переваров В.В., Капельянц А.С. Фотоинаktivация покоящихся форм *Mycobacterium smegmatis* посредством их эндогенных порфиринов. VI Съезд биофизиков России. 2019. Научные труды (том 2), С. 277. DOI: 10.31429/SbR6.2019.001 http://conf-2019.biophys.ru/work/BioPhys-2019_V2.pdf