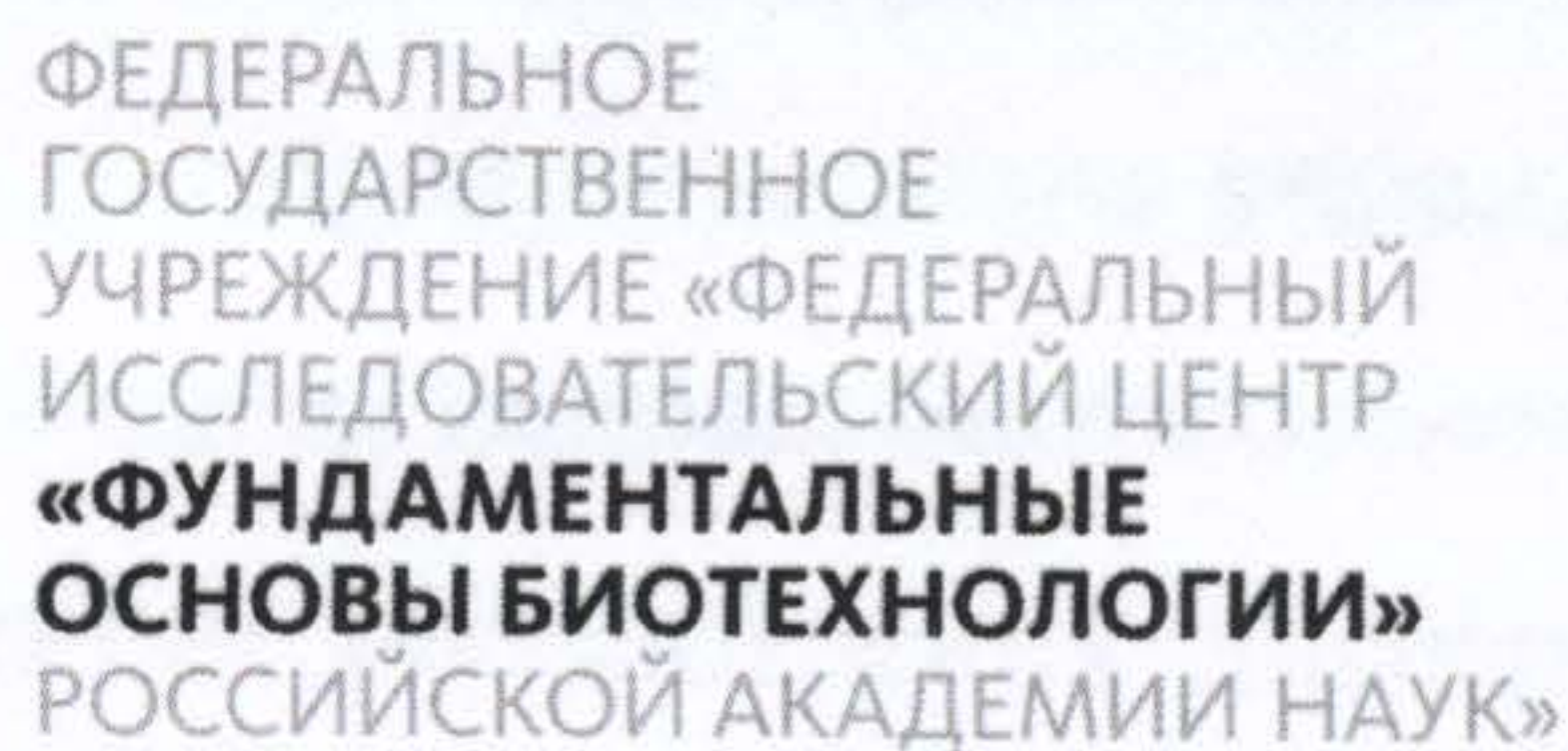




119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

No 85-07-77/1116

OT

Директор Федерального
государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

д. б. н. Федоров А. Н.



Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН на диссертационную работу Шлеевой Маргариты Олеговны «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, выполненную в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

В 1999 году Шлеева М.О. окончила Брянский государственный педагогический университет им. академика И.Г. Петровского с присуждением квалификации «учитель биологии и химии». С 2000 по 2003 год обучалась в очной аспирантуре Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. В 2004 году Шлеева М.О. защитила кандидатскую диссертацию «Покоящиеся формы бактерий рода *Mycobacterium*: получение, биохимические факторы реактивации» по специальности 03.01.04 Биохимия (диплом КТ № 144679) и продолжила работу в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, где работает по настоящее время в должности старшего научного сотрудника.

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Капрельянц Арсений Сумбатович, заведующий лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

По результатам рассмотрения диссертации «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Данная работа посвящена изучению особенностей биохимии покоящегося состояния микобактерий, в частности внутриклеточного патогена *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Считается, что патогенные медленнорастущие микобактерии, такие, как *Mycobacterium leprae* или *Mtb*, сохраняются *in vivo* длительное время после начального заражения, переходя 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). В 10-15 % случаев покоящиеся микобактерии переходят к активному делению, что приводит к активации заболевания (Lillebaek et al., 2002). Несмотря на то, что данное явление было описано более 80-ти лет назад, до сих пор отсутствует ясное понимание природы латентной стадии ТБ и молекулярных механизмов, посредством которых активные бактерии трансформируются в покоящиеся формы, переживают длительное время в этом состоянии и возвращаются к активному делению.

Полагают, что возбудитель ТБ в состоянии покоя приобретает устойчивость ко многим известным антибактериальным препаратам и способен десятилетиями сохранять жизнеспособность в организме человека и под воздействием ряда факторов переходить в состояние активного размножения, вызывая рецидив заболевания (Ehlers, 2009).

Покоящиеся клетки микобактерий невозможно извлечь из тканей и органов инфицированных людей поскольку их количество крайне мало. В связи с этим возникают трудности с изучением механизмов и процессов, характерных для состояния покоя микобактерий и поиском мишеней для разработки новых методов борьбы с этой формой инфекции. Кроме этого, характерным свойством микобактерий при латентном ТБ является неспособность расти на стандартных лабораторных средах, что затрудняет выделение таких форм стандартными лабораторными методами. Практически единственным подходом для изучения покоящихся форм является создание адекватных моделей *in vitro*, наиболее близко отражающих ситуацию *in vivo*.

Несмотря на многочисленные попытки получить покоящиеся микобактерии (ПМ) в

лабораторных условиях, до сих пор не удавалось получить *in vitro* ПМ, обладающие всеми свойствами возбудителя, 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 стрессовых факторов.

Во многих работах описаны попытки достичь перехода микобактерий в состояние покоя *in vitro* путем резкого воздействия какого-либо стрессового фактора на активно делящиеся бактерии. Однако под таким давлением активно растущие микобактерии, очевидно, не успевают должным образом структурно перестроиться и происходит лишь остановка синтетического метаболизма и остановка клеточного деления, при этом биохимически клетки изменялись слабо. Наиболее удачной и простой в исполнении оказалась модель Вейна, в которой в качестве стрессового фактора для микобактерий выступает ограничение по кислороду. Было показано, что быстрое истощение кислорода в культуре ведет к массовой гибели большинства клеток микобактерий, а постепенное, плавное развитие гипоксии переводит микобактерий в неделящееся состояние; однако полученные формы микобактерий сохраняли способность к росту 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. Клетки Вейна не были способны к длительному выживанию в состоянии отсутствия репликации. Поскольку гипоксия не является первичным стрессовым фактором при попадании возбудителя ТБ в организм хозяина, очевидно, что необходимо искать другие факторы, индуцирующие образование ПМ.

Кроме этой модели, разработаны еще некоторые подходы, связанные с недостатком питательных компонентов в среде роста. Исходя из предположения, что в некротической гранулеме *Mtb* испытывает недостаток питательных веществ, была разработана модель голодания, в которой изначально выращенные в оптимальной среде роста микобактерии отмывали и помещали в фосфатный буфер, вследствие чего останавливался рост бактерий и снижалась активность клеточного метаболизма (Loebel et al., 1933). В более поздней работе для микобактерий, полученных с использованием этой модели, было показано снижение активности дыхания и уровня экспрессии ряда генов (Betts et al., 2002). При этом существенных морфологических и биохимических перестроек таких

микобактерий не наблюдалось, и они были способны к немедленной реактивации при наличии необходимых питательных субстратов в составе плотных сред. Известно, что в условиях недостатка питательных веществ и в результате действия других стрессов, переход на альтернативный «анаэробный» тип обмена веществ является универсальным способом поддержания реакций метаболизма (Kaprelyants et al., 1993).

Ранее было продемонстрировано, что исключение калия из среды роста приводило к появлению «некультивируемых» форм *Mycobacterium smegmatis* (Msm) (Shleeve et al., 2004), которые были способны к реактивации при перенесении в свежую сбалансированную среду. Позже этот подход был применен для *Mtb* (Salina et al., 2014). Однако полученные в отсутствие калия формы *Mtb* не могут долго поддерживать жизнеспособность без размножения, что не вполне соответствует ситуации, характерной для возбудителя латентного ТБ, который 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* и такие модели нельзя рассматривать как истинно покоящиеся. Скорее они соответствуют состоянию «выживания при голодании» («starvation survival») (Kaprelyants et al., 1993). Таким образом, вопрос, насколько неделяющиеся микобактерии, полученные в существующих моделях *in vitro*, адекватны покоящимся микобактериям *in vivo* при латентном ТБ остается открытым.

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 стрессовые факторы, как оксид азота, гидролитические ферменты лизосом, активные формы кислорода и низкие значения pH. *Mtb* способен 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 стрессовых

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 это одно из первых препятствий, с которым сталкивается патоген при попадании в организм хозяина, можно ожидать формирование покоящихся форм микобактерий в условиях стационарной фазы развития культуры при постепенном снижении значения pH среды. Это предположение нуждалось в экспериментальной проверке, что и являлось предметом данного исследования. Мы ожидали получения ПМ в количествах, достаточных для проведения их всесторонней биохимической характеристики, включая анализ протеома, а в итоге - характеристику механизмов поддержания жизнеспособности микобактерий в длительном состоянии покоя.

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

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 сапрофитной бактерии *Micrococcus luteus* семейства *Micrococcaceae* из состояния покоя (Kaprelyants et al., 1996; Mukamolova et al., 1998). Гены этих белков были обнаружены и 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.

Выяснилось, что Rpf-индуцируемый механизм реактивации *in vivo* зависит от наличия некоторого количества метаболически активных бактерий в популяции покоящихся форм, так как синтез белка Rpf не начинается при полном отсутствии деления в популяции. Это условие трудновыполнимо в реальной ситуации, поскольку количество микобактерий в организме животного или человека с латентным ТБ может быть очень низким. Мы предположили, что начало процесса реактивации может быть связано с более простыми, чем Rpf, индукторами - продуктами метаболизма микобактерий или организма хозяина. Известно, что возбудитель ТБ может использовать липиды хозяина в качестве источника углерода (Miner et al., 2009), поэтому мы сочли, что поиск инициаторов реактивации среди веществ липидной природы перспективен. С другой стороны, практически не было известно какие биохимические процессы происходят после индукции перехода ПМ в активное состояние. Соответственно эти процессы требовали экспериментального изучения.

В связи с вышеизложенным можно заключить, что понимание механизмов перехода микобактерий в состояние покоя и возвращения к активному делению требует новых подходов, включающих разработку моделей длительной персистенции микобактерий *in vitro*, проведения комплекса микробиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований. Полученные знания могут быть использованы для поиска новых, более эффективных решений проблемы латентного ТБ, включающих разработку новых методов в диагностике этого вида инфекции и новых способов инактивации возбудителя этого заболевания.

Целью настоящей работы 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.

Научная новизна

- Впервые создана модель образования длительно выживающих покоящихся бактерий на основе адаптации микобактерий *Msm*, *Mtb* и *Corynebacterium jeikeium* к условиям плавного понижения pH внешней среды и последующего хранения 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/стрессовых факторов и способностью сохраняться без размножения в жидких средах длительное время без существенной потери жизнеспособности.

- Впервые выявлены три стадии покоя микобактерий, отражающие постепенное снижение метаболической активности, развитие «некультивируемости» и способности ПМ к реактивации.

- Установлено, что мыши, инфицированные полученными *in vitro* в условиях рН-индукции покоящимися формами *Mtb* проявляли симптомы, характерные для хронического/латентного ТБ. Спустя 1.5 лет после заражения у мышей развивалась активная форма ТБ.

- Впервые выявлена общая черта между покоящимися микобактериями и истинными спорами актиномицетов и аскомицетовых дрожжей, которая касается особенностей накопления и превращения трегалозы как в процессе перехода в состояние покоя, так и при реактивации.

- Охарактеризован протеомный профиль микобактерий в состоянии длительного покоя. Показано, что в период длительного выживания в условиях стресса в покоящихся бактериях содержится значительное разнообразие сохраненных белков, причем значительная часть (45 %) из них не выявляется в протеоме активно размножающихся микобактерий. Некоторые ферменты центрального метаболизма (гликолиз, цикл Кребса) остаются потенциально активными. В протеоме ПМ выявлено большое число белков, принимающих участие в защите бактериальной клетки от действия стрессовых факторов.

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

- Продемонстрировано, что нитрофенилтиоцианаты ингибируют энзиматическую активность белков Rpf и способны подавлять скорость реактивации ПМ из

«некультивируемого» состояния *in vitro* и *in vivo*.

- Выявлено, что процесс реактивации ПМ включает несколько стадий: истинная лаг-фаза, включающая гидролиз трегалозы; метаболическая реактивация, включающая начало биосинтетических процессов и начальная стадия размножения клеток.
- Обнаружено накопление свободных порфиринов в покоящихся микобактериях, очевидно, вследствие блокирования терминальных реакций синтеза гема. Установлено, что ПМ, содержащие эндогенные порфирины, могут быть фотоинактивированы 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 *in vitro* и *in vivo*, имитирующие состояние возбудителя в период латентного ТБ, являются новым инструментом для изучения механизмов образования и реактивации покоящихся форм возбудителя ТБ и оценки вклада разных путей метаболизма, вовлеченных в процесс перехода микобактерий в покоящееся состояние и выхода из него, а также для выявления особенностей функционирования иммунной системы хозяина в период латентной инфекции. Созданная модель хронического/латентного ТБ *in vivo*, может быть применена для исследования ответа иммунной системы хозяина на эту форму возбудителя заболевания.

Полученные покоящиеся клетки микобактерий могут быть использованы для разработки и тестирования новых методов и средств с антибактериальной активностью, эффективных в отношении как покоящихся, так и реактивирующих микобактерий, персистирующих в организме хозяина. Полученные в ходе работы знания могут быть использованы в разработке новых методов диагностики латентного ТБ и борьбы с этой формой инфекции, в частности, методов дезинфекции и подходов к фотодинамической инактивации микобактерий. Белки, обнаруженные при анализе протеомного профиля покоящихся форм *Mtb*, являются потенциальными мишенями для создания противотуберкулезных препаратов, а также могут быть использованы для диагностики латентного туберкулеза.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Личный вклад диссертанта 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.

Степень достоверности

Научные положения и выводы диссертации Шлеевой М.О. обоснованы и достоверны, и логически вытекают из полученных достоверных экспериментальных данных.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы соответствуют специальности 03.01.04 Биохимия, результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

Апробация работы

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.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени.

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science :

1. Trutneva K.A., **Shleeva M.O.**, Demina G.R., Vostroknutova G.N. and Kaprelyans A.S. (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., Капрельянц 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 I.D., Kazachkina N.I., Perevarov V.V., Kaprelyants A.S. (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., Капрельянц 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, **Shleeва 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, **Shleeва 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. **Shleeва 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. **Shleeва 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, **Shleeва 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, **Shleeва 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, **Shleeва 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. **Shleeва 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. **Shleeва 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, **Shleeва 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., **Shleeва 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 M.O.**, 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 изопреноидов у корино- и микобактерий. *Биохимия*. 77(4), 461-473.

18. Назарова Е.В., **Шлеева M.O.**, 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. **Shleeва 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 M.O.**, 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. Мulyukin A.L., Кудыкина Ю.К., **Шлеева M.O.**, 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 M.O.**, 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, **Shleeва 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 M.O.**, Капрельянц А.С. (2006) Роль межклеточных взаимодействий при образовании и реактивации "некультивируемых" микобактерий. *Микробиология*. Т. 75. № 4. С. 502.

25. Downing KJ, Mischenko VV, **Shleeва 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.

Патент:

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. Shleeва**, 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. Shleeва**, 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. Shleeва**, 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., **Shleeва M.**, Demina G., Kaprelyants A. Proteomic features of dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells with ovoid morphology. FEBS Open Bio, 2018, S1, p.401
5. **Shleeва 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. FEBS Open Bio, 2018, Volume 8, S1, p.400
6. K. Trutneva, **M. Shleeва**, 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., **Shleeва 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. **Shleeва 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. **Shleeва**, 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. Shleeва**, V. Nikitushkin, O. Ryabova, A. Ruggiero, R. Berisio, A. Kaprelyants. Derivatives of 2-nitrophenyl thiocyanates as the rpf inhibitors. FEMS 2013, Leipzig, Germany, July 21-25
11. G.R. Demina, **M.O. Shleeва**, V.D. Niktushkin, 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., Капрельянц 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. Пущино, 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., Никитушкин В.Д., Соловьев И.Д., Казачкина Н.И., Переваров В.В., Капрельянц 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

Рекомендуемые оппоненты:

Габибов Александр Габибович, 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.

Рекомендуемая ведущая организация

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

Диссертация «Особенности биохимии и физиологии покоящихся микобактерий» Шлеевой Маргариты Олеговны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий биохимии стрессов микроорганизмов, биомедицинских исследований, физической биохимии, молекулярных основ биотрансформаций, биохимии азотификсации и метаболизма азота, молекулярного имиджинга, группы редактирования геномов микроорганизмов и группы генной инженерии низших эукариот Института биохимии имени А.Н. Баха и лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии имени С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатории иммуногенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» и лаборатории химии полиэлектролитов Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 30 человек. Результаты голосования: «за» - 30 человек, «против» - нет,

*Председатель совместного семинара лабораторий
заведующий лабораторией
биохимии азотофиксации и метаболизма азота,
доктор биологических наук*

Way

научный сотрудник лаборатории
биохимии стрессов микроорганизмов,
кандидат биологических наук



Подпись Голубов А. Р.
Никитускина В. Д.
ЗАВЕРЯЕТСЯ лш
Заведующий канцелярией
« 07 » 20 20 г.